

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

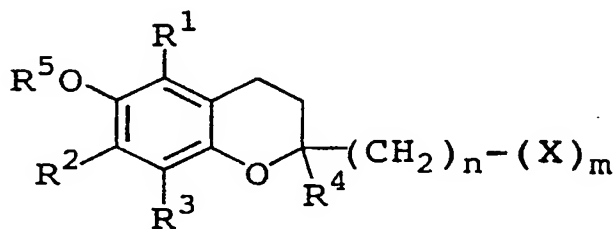
**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

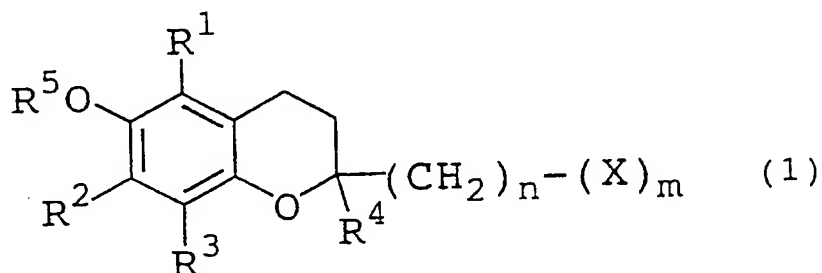
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



<b>(51) 国際特許分類7</b> A61K 31/7048, 7/42, 7/48, A61P 17/00, 43/00 // C07H 15/26, 17/065	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO00/57889</b>  <b>(43) 国際公開日</b> 2000年10月5日(05.10.00)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP00/02034 <b>(22) 国際出願日</b> 2000年3月30日(30.03.00)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平11/93874 1999年3月31日(31.03.99) JP 特願2000/22596 2000年1月31日(31.01.00) JP  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> シーシーアイ株式会社(CCI CORPORATION)[JP/JP] 〒501-3923 岐阜県関市新迫間12番地 Gifu, (JP) <b>(72) 発明者; および</b> <b>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)</b> 村瀬博宣(MURASE, Hironobu)[JP/JP] 〒502-0071 岐阜県岐阜市長良2435番地の178 Gifu, (JP) 藤井利秋(FUJII, Toshiaki)[JP/JP] 〒505-0051 岐阜県美濃加茂市加茂野町鷹之巣1544 Gifu, (JP) <b>(74) 代理人</b> 八田幹雄, 外(HATTA, Mikio et al.) 〒102-0084 東京都千代田区二番町11番地9 ダイアパレス二番町 Tokyo, (JP)		<b>(81) 指定国</b> CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)  <b>添付公開書類</b> 国際調査報告書

**(54) Title: SKIN PREPARATIONS FOR EXTERNAL USE****(54) 発明の名称** 皮膚外用剤**(57) Abstract**

Skin preparations for external use which contain chromanol glycosides represented by general formula (1) wherein  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  and  $R^4$  are the same or different and each represents hydrogen or lower alkyl;  $R^5$  represents hydrogen, lower alkyl or lower acyl; X represents a monosaccharide residue or an oligosaccharide residue in which the hydrogen atom in the hydroxyl group may be substituted by lower alkyl or lower acyl; n is an integer of from 0 to 6; and m is an integer of from 1 to 6. These preparations are novel preparations which are excellent in stability and transdermal absorbability, can safely exert favorable effects in a small dose and are usable in preventing and treating skin disorders. They are highly useful as preventives and remedies for disorders caused by ultraviolet light, preventives and ameliorators for skin pigmentation, skin whitening agents, skin age resistors, cell potentiators, etc.



(ただし、式中  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$  及び  $R^4$  は同一又は異なる水素原子又は低級アルキル基を表し、 $R^5$  は水素原子、低級アルキル基又は低級アシル基を表し、 $X$  は糖残基中の水酸基の水素原子が低級アルキル又は低級アシル基で置換されていてもよい単糖残基又はオリゴ糖残基を表し、 $n$  は 0 ～ 6 の整数であり、及び  $m$  は 1 ～ 6 の整数である) で表されるクロマノール配糖体を含む皮膚外用剤である。安定性、経皮吸収性に優れ、安全かつ少容量で効果的に作用し、皮膚障害を予防、治療しうる新規な皮膚外用剤であり、紫外線障害予防及び治療剤、皮膚色素沈着予防及び改善剤、皮膚美白化剤、皮膚老化防止剤、又は細胞賦活剤等として極めて有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AG アンティグア・バーブーダ	DZ アルジェリア	LC セントルシア	SD スーダン
AL アルバニア	EE エストニア	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AM アルメニア	ES スペイン	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AT オーストリア	FI フィンランド	LR リベリア	SI スロヴェニア
AU オーストラリア	FR フランス	LS レソト	SK スロヴァキア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LT リトアニア	SL シェラ・レオネ
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BB バルバドス	GD グレナダ	LV ラトヴィア	SZ スワジランド
BE ベルギー	GE グルジア	MA モロッコ	TD チャード
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MC モナコ	TG トーゴ
BG ブルガリア	GM ガンビア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BJ ベナン	GN ギニア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BR ブラジル	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR トルコ
BY ベラルーシ	GW ギニア・ビサオ	共和国	TT トリニダード・トバゴ
CA カナダ	HR クロアチア	ML マリ	TZ タンザニア
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	MN モンゴル	UA ウクライナ
CG コンゴ	ID インドネシア	MR モーリタニア	UG ウガンダ
CH スイス	IE アイルランド	MW マラウイ	UZ 米国
CI コートジボアール	IL イスラエル	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CM カメルーン	IN インド	MZ モザンビーク	VN ヲトナム
CN 中国	IS アイスランド	NE ニジェール	YU ユーゴスラヴィア
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NL オランダ	ZA 南アフリカ共和国
CU キューバ	JP 日本	NO ノールウェー	ZW ジンバブエ
CY キプロス	KE ケニア	NZ ニュー・ジーランド	
CZ チェッコ	KG キルギスタン	PL ポーランド	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
DK デンマーク	KR 韓国	RO ルーマニア	

## 明 細 書

## 皮膚外用剤

## 5 技術分野

本発明は、新規な皮膚外用剤に関する。詳しくは、水溶性のクロマノール配糖体を有効成分とする皮膚外用剤に関するものである。

## 背景技術

- 10 皮膚は人体の最表面にあるため、紫外線、熱、化学物質等、環境中に存在する種々のストレスを受けやすい。そのうち、紫外線（特に290～320nmの波長領域であるUVB）は、皮膚表面および皮膚組織内に活性酸素やフリーラジカルを発生させ、サンバーン（日焼け）や皮膚癌等の原因になるといわれている（井上正康編著「活性酸素と病態」学
- 15 会出版センター1992年10月1日初版発行、第567～576頁）。特に、近年オゾン層破壊により地表に届く紫外線量は増加の一途をたどっており、紫外線吸収剤による防護だけでは充分ではなく、皮膚組織内等において発生した活性酸素やフリーラジカルを消去することが重要になってきている。さらに、最近、炎症性ケミカルメディエータであるサ
- 20 イトカインが紫外線により誘導されること、これにより白血球等の免疫細胞が誘導され局所的な炎症反応が生じ、皮膚に強いダメージを与えること等がわかってきた（Thomas S. Kupper et al. : J. Clin. Invest. : Vol 80, August 1987, 430-436）。サイトカインの発現を抑制する物質としてはコルチ
- 25 コステロイド等のステロイドがあるが、免疫抑制効果があるため、消耗（Wasting）症候群、糖尿病、骨粗しょう症等の有害な副作用を

引き起こすことが知られている。したがって、紫外線による皮膚の局所炎症において、原因となる活性酸素やフリーラジカルを有効に消去し、かつ誘導されるサイトカインの産生をも抑制する物質の開発が望まれている。

- 5       また、上記局所炎症以外にも、皮膚が紫外線、熱、化学物質等により一度に多量のストレスを受けた場合、表皮基底細胞や真皮繊維芽細胞などの分裂能の低下を招くことが知られており、これに伴い皮膚全体が萎縮するばかりでなく、表皮細胞が作り出す天然保湿成分や細胞間マトリックス成分の減少や変性等を引き起こし、シミ、そばかすの増加やシワ、
- 10       タルミの形成等といった皮膚老化の進行をももたらすと考えられている。そこで、皮膚内のコラーゲン等のマトリックス成分を合成する線維芽細胞を活性化することにより、コラーゲンやヒアルロン酸等の代謝を活性化して皮膚細胞の柔軟性、弾力性を改善したり、ターンオーバーを促進させ皮膚の色素沈着を抑制し皮膚の美白化を促進する試みが行われている。
- 15       このような皮膚細胞の活性化および老化防止のための物質としては、ビタミンC、ビタミンE、レチノイン酸、レチノール誘導体等が知られているが、いずれも安定性、経皮吸収性、催奇形性等において問題があり、適用範囲が極めて限定されているのが現状であった。

- 一方、本発明に用いられるクロマノール配糖体は既知の化合物である
- 20       （特開平7-118287号公報、特開平9-249688号公報、特開平11-21291号公報）。該クロマノール配糖体は、代表的なビタミンEである $\alpha$ -トコフェロールのクロマン環の2位のフィチル基をアルコールで置換し、さらに糖を結合させて得られるものであり、高い水溶性と優れた抗酸化作用を有する。しかし、該クロマノール配糖体を
- 25       前述のような皮膚障害予防および治療剤や化粧品等の皮膚外用剤に利用することは知られていない。

本発明は上記従来技術の有する問題点に鑑みなされたものであり、その目的とするところは、副作用を伴うことなく少用量で効果的に作用して紫外線等による皮膚障害を抑制し治癒し得る新規な皮膚外用剤を提供することにある。

- 5      本発明の他の目的は、紫外線による皮膚の局所炎症において、原因となる活性酸素やフリーラジカルを有効に消去し、かつ誘導されるサイトカインの産生をも抑制し得る新規な皮膚外用剤を提供することにある。

本発明のさらに他の目的は、紫外線による皮膚の色素沈着を予防・改善し、優れた美白化作用を有する新規な皮膚外用剤を提供することにある。

10      。

本発明のさらに他の目的は、皮膚細胞を活性化し、皮膚の老化を防止し得る新規な皮膚外用剤を提供することにある。

本発明のさらに他の目的は、有効成分を高濃度で含有する水性製剤とすることができ、安定性、経皮吸収性に優れた新規な皮膚外用剤を提供

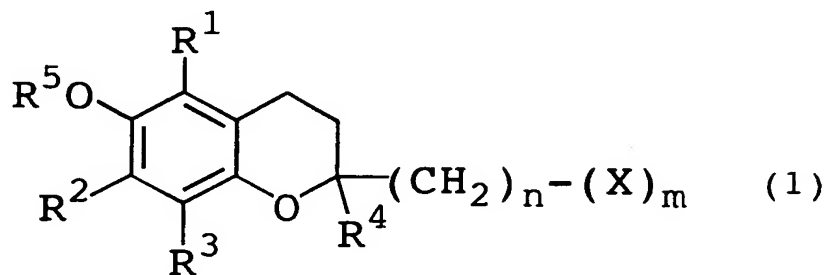
15      することにある。

#### 発明の開示

本発明者らは、紫外線等による皮膚障害の予防および治療について鋭意研究を重ねた結果、前記クロマノール配糖体が、極めて効果的に皮膚

20      障害を抑制し治癒し得ることを見出し本発明を完成した。

即ち、本発明は、下記一般式（１）



(ただし、式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$  および  $R^4$  は同一または異なる水素原子または低級アルキル基を表し、 $R^5$  は水素原子、低級アルキル基または低級アシル基を表し、 $X$  は糖残基中の水酸基の水素原子が低級アルキル基または低級アシル基で置換されていてもよい単糖残基またはオリゴ糖残基を表し、 $n$  は 0 ～ 6 の整数であり、および  $m$  は 1 ～ 6 の整数である) で表されるクロマノール配糖体を含むしてなる皮膚外用剤である。

本発明はまた、前記クロマノール配糖体は 2- ( $\alpha$ -D-グルコピラノシル) メチル-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-6-オール、2- ( $\beta$ -D-ガラクトピラノシル) メチル-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-6-オール、2- ( $\beta$ -D-フルクトフラノシル) メチル-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-6-オールまたは 2- ( $\alpha$ -D-マンノピラノシル) メチル-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-6-オールである前記皮膚外用剤である。

本発明はさらに、水性製剤である前記皮膚外用剤である。

本発明はまた、皮膚障害予防および治療剤である前記皮膚外用剤である。

本発明はさらに、紫外線障害予防および治療剤、皮膚色素沈着予防および改善剤、皮膚美白化剤、皮膚老化防止剤または細胞賦活剤である前記皮膚外用剤である。

本発明はまた、化粧品である前記皮膚外用剤である。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、TMG の 200 nm ～ 400 nm における吸収スペクトルを測定した紫外スペクトルのグラフである。

発明を実施するための最良の形態

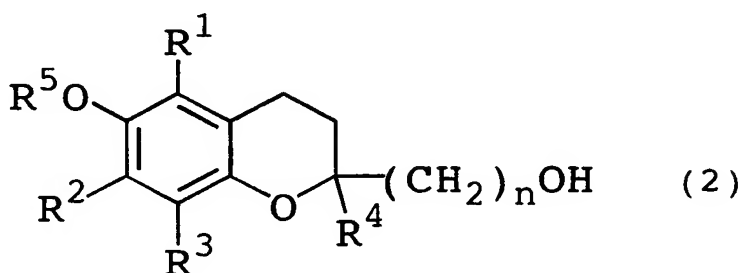


本発明の皮膚外用剤は、前記一般式（１）で表されるクロマノール配糖体を有効成分とすることを特徴とするものである。

前記一般式（１）において、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$  および  $R^5$  の低級アルキル基としては、炭素原子数が１～８、好ましくは１～６の低級アルキル基がよく、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基、ペンチル基、イソペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基等が挙げられる。これらの中では、メチル基またはエチル基が好ましい。また、 $R^5$  の低級アシル基としては、炭素原子数が１～８、好ましくは１～６の低級アシル基がよく、例えば、ホルミル基、アセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、イソブチリル基、バレリル基、イソバレリル基、ピバロイル基、ヘキサノイル基、ヘプタノイル基、オクタノイル等が挙げられる。これらの中では、アセチル基、プロピオニル基またはブチリル基が好ましい。また、 $X$  の単糖残基としては、グルコース、ガラクトース、フコース、キシロース、マンノース、ラムノース、フルクトース、アラビノース、リキソース、リボース、アロース、アルトロース、イドース、タロース、デオキシリボース、２-デオキシリボース、キノボース、アベクオース等の糖残基が挙げられる。 $X$  のオリゴ糖残基としては、上記単糖が２～４個結合したもの、例えばマルトース、ラクトース、セロビオース、ラフィノース、キシロビオース、スクロースの糖残基等が挙げられる。これらの中ではグルコース、ガラクトース、フコース、キシロース、ラムノース、マンノース、フルクトース等の単糖残基が好ましい。また、 $X$  の糖残基中の水酸基の水素原子は低級アルキル基、好ましくは炭素原子数が１～８の低級アルキル基、または低級アシル基、好ましくは炭素原子数が１～１０の低級アシル基で置換されていてもよい。さらに、 $n$  は０～６、好ましくは１～４の整数であり、 $m$  は１～６、好ましくは１～３の整数である。

一般式(1)で表されるクロマノール配糖体の好ましい例としては、2-  
 (α-D-グルコピラノシル)メチル-2, 5, 7, 8-テトラメチル  
 クロマン-6-オール、2-(β-D-ガラクトピラノシル)メチル  
 -2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-6-オール、2-(β-L-  
 5-フコピラノシル)メチル-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-  
 6-オール、2-(α-L-ラムノピラノシル)メチル-2, 5, 7,  
 8-テトラメチルクロマン-6-オール、2-(β-D-キシロピラノ  
 シル)メチル-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-6-オール、  
 2-(β-D-グルコピラノシル)メチル-2, 5, 7, 8-テトラメ  
 10-チルクロマン-6-オール、2-(β-D-フルクトフラノシル)メチ  
 ル-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-6-オール、2-(α-  
 D-マンノピラノシル)メチル-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマ  
 ン-6-オール等が挙げられる。

本発明に用いられるクロマノール配糖体は、例えば特開平7-118  
 15-287号公報、特開平9-249688号公報、特開平11-21291  
 号公報に記載の方法により、下記一般式(2)：



(ただし、式中、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ 、 $\text{R}^5$  および  $n$  は前記と同義で  
 ある)で表される2-置換アルコールおよびオリゴ糖類を相当する糖転  
 20-位作用を触媒する酵素の存在下に反応させ、2-置換アルコールの2位  
 の水酸基に対して特異的に糖の特定の水酸基を結合させることからなる  
 酵素反応によって製造される(酵素法)。

上記反応において原料として用いられる一般式(2)で表される2-置換アルコール(以下、単に「2-置換アルコール」という)は公知の物質であり、例えば、特公平1-43755号公報や特公平1-49135号公報等の開示された方法により得ることができる。また、例えば、  
5 一般式(2)中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$  および  $R^4$  がメチル基、 $R^5$  が水素原子であり、 $n$ が1である2-置換アルコールは、 $\alpha$ -トコフェロールのクロマン環の2位のフィチル基がカルボキシ基で置換された構造を有する6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸(商品名「トロロックス(Trolox)」)を水素化リチウムアルミニウムの存在下においてジエチルエーテル中で加熱還流処理すること等により容易に得ることができる。  
10

上記反応において使用される糖転位作用を触媒する酵素は、当該反応に用いる糖の種類によって以下のように使い分けることが好ましい。

(1) 2-置換アルコールに $\alpha$ -結合でグルコース残基を結合させる  
15 場合:

(a) マルトースからマルトテトラオース位のマルトオリゴ糖に対しては $\alpha$ -グルコシダーゼ( $\alpha$ -glucosidase, EC 3. 2. 1. 20)を作用させることが望ましい。 $\alpha$ -グルコシダーゼとしては、ほぼ全ての起源由来のものを用いることができ、具体的には、東洋紡績  
20 株式会社製のサッカロマイセス属(*Saccharomyces* sp.)由来の $\alpha$ -グルコシダーゼ、オリエンタル酵母工業株式会社製のサッカロマイセス セロビイシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)由来の $\alpha$ -グルコシダーゼ、天野製薬株式会社製のアスペルギルス ニガー(*Aspergillus niger*)由来  
25 の $\alpha$ -グルコシダーゼ、和光純薬工業株式会社製のサッカロマイセス属(*Saccharomyces* sp.)由来の $\alpha$ -グルコシダーゼ、

シグマ (SIGMA) 製のベーカー イースト (Bakers yeast) 由来の $\alpha$ -グルコシダーゼ、バチルス属 (Bacillus) 由来の $\alpha$ -グルコシダーゼ等が挙げられる。

(b) 可溶性澱粉または澱粉に対しては4- $\alpha$ -グルカノトランスフェラーゼ (4- $\alpha$ -D-glucanotransferase, EC 2.4.1.25) を作用させることが望ましい。

(2) 2-置換アルコールに $\alpha$ -結合でグルコース残基またはマルトオリゴ糖残基を結合させる場合：

マルトオリゴ糖、可溶性澱粉、澱粉またはシクロデキストリン ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ) などに対してはシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ (cyclodextrin glucanotransferase, EC 2.4.1.19) を作用させることが望ましい。代表的な例としては、天野製薬株式会社製のバチルス マセランス (Bacillus macerans) 由来のシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ、株式会社林原生物化学研究所製のバチルス ステアロサーモフィラス (Bacillus stearothermophilus) 由来のシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ、その他にはバチルス メガテリウム (Bacillus megaterium)、バチルス サーキュランス ATCC 9995 (Bacillus circulans ATCC 9995) 由来のシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼなどが挙げられる。

(3) 2-置換アルコールに $\beta$ -結合でグルコース残基を結合させる場合：

(a) セロビオース、カードランまたはラミナランなどの $\beta$ -結合よりなるオリゴ糖に対しては $\beta$ -グルコシダーゼ ( $\beta$ -glucosidase, EC 3.2.1.21) を作用させることが望ましい。

(b) リン酸存在下のセロビオースに対してはセロビオース ホスホ  
リラーゼ (cellobiose phosphorylase, EC  
2. 4. 1. 20) を作用させることが望ましい。

(4) 2-置換アルコールに $\alpha$ -結合でガラクトース残基を結合させ  
5 る場合 :

メリビオースまたはラフィノースなどに対しては $\alpha$ -ガラクトシダー  
ゼ ( $\alpha$ -galactosidase, EC 3. 2. 1. 22) を作用  
させることが望ましい。

(5) 2-置換アルコールに $\beta$ -結合でガラクトース残基を結合させ  
10 る場合 :

(a) ラクトースなどに対しては $\beta$ -ガラクトシダーゼ ( $\beta$ -gal  
actosidase, EC 3. 2. 1. 23) を作用させることが望  
ましい。

(b) アラビノガラクタンなどに対してはエンドー 1, 4- $\beta$ -ガラ  
15 クタナーゼ (Endo-1, 4- $\beta$ -galactanase, EC 3.  
2. 1. 89) を作用させることが望ましい。

(6) 2-置換アルコールに $\beta$ -結合でフラクトース残基を結合させ  
る場合 :

(a) ショ糖、ラフィノースまたはメリビオースなどに対してはレバ  
20 ンシュークラーゼ (levansucrase, EC 2. 4. 1. 1  
0) を作用させることが望ましい。

(b) ショ糖に対しては $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ ( $\beta$ -fruc  
t ofuranosidase, EC 3. 2. 1. 26) を作用させる  
ことが望ましい。

(c) イヌリンなどに対してはイヌリンフルクトトランスフェラーゼ  
25 (inulin fructotransferase, EC 2. 4.

1. 93) を作用させることが望ましい。

上記反応における反応条件は、使用するクロマノール配糖体や酵素の種類によって異なるが、例えば、一般式(1)中のmが1であるクロマノール配糖体を $\alpha$ -グルコシダーゼを用いて合成する場合には、2-置換アルコールを糖溶液に溶解させることが望ましい。そのためには有機溶媒の添加が望ましく、例えば、ジメチルスルホキシド、N, N-ジメチルホルムアミド、メタノール、エタノール、アセトン、およびアセトニトリルなどが挙げられ、 $\alpha$ -グルコシダーゼの転移活性を高める点を考慮すると、ジメチルスルホキシドやN, N-ジメチルホルムアミドが好ましく使用される。有機溶媒の添加濃度は、1~50(体積/体積)%であり、反応効率を考えると5~35(体積/体積)%であることが好ましい。

2-置換アルコールの濃度は、反応液中において飽和濃度若しくはそれに近い濃度にするのが望ましい。用いる糖の種類はマルトースからマルトテトラオース位の低分子のものが良く、好ましくはマルトースである。糖の濃度は1~70(質量/体積)%、好ましくは30~60(質量/体積)%である。pHは4.5~7.5、好ましくは5.0~6.5である。反応温度は10~70℃、好ましくは30~60℃である。反応時間は1~40時間、好ましくは2~24時間である。但し、これらの条件は使用する酵素量等により影響をうけることはいうまでもない。反応終了後、反応液をXAD(オルガノ株式会社)を担体として用いたカラムクロマトグラフィーで処理することにより、目的とするクロマノール配糖体が高純度で得られる。

また、例えば、一般式(1)中のmが1であるクロマノール配糖体をシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼを用いて合成する場合の反応条件としては、2-置換アルコールを糖溶液に溶解させることが

望ましい。そのためには有機溶媒の添加が望ましく、ジメチルスルホキシド、N，N-ジメチルホルムアミド、メタノール、エタノール、アセトンおよびアセトニトリルなどが挙げられる。添加する有機溶媒の濃度は1～50（体積／体積）％、好ましくは反応効率を考えると5～35（体積／体積）％である。2-置換アルコールの濃度は反応液中において、飽和濃度もしくはそれに近い高い濃度にすることが望ましい。

上記反応において用いられる糖の種類としては、マルトトリオース以上の重合度を持つマルトオリゴ糖、可溶性澱粉、澱粉およびシクロデキストリン（ $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ）などが好ましく挙げられる。糖の濃度は1～70（質量／体積）％、好ましくは5～50（質量／体積）％である。pHは4.5～8.5、好ましくは5.0～7.5である。反応温度は10～70℃、好ましくは30～60℃である。反応時間は1～60時間、好ましくは2～50時間である。但し、これらの条件は使用する酵素量により影響を受ける。このような反応により得られたクロマノール配糖体はmの数が1から8位の混合物となる。そこで、この混合物をグルコアミラーゼ（EC 3.2.1.3）を用いて処理することによって、一般式（1）中のmが1であるクロマノール配糖体だけを得ることができる。この際の反応温度は20～70℃、好ましくは30～60℃であり、反応時間は0.1～40時間、好ましくは1～24時間である。但し、これらの条件は使用する酵素の量により影響を受ける。次に、上記グルコアミラーゼ処理後の液を、XAD（オルガノ株式会社）を担体として用いたカラムクロマトグラフィー処理することにより、一般式（1）中のmが1であるクロマノール配糖体が高純度で得られる。

一般式（1）中のmが2であるクロマノール配糖体を得る場合には、上記と同様の条件下で、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼによって得られる一般式（1）におけるmが1から8位の混合物の形

態を有するクロマノール配糖体に $\beta$ -アミラーゼ (E C 3 . 2 . 1 .

2) を作用させることにより、一般式 (1) におけるmが1または2であるクロマノール配糖体のみが得られる。この時の反応温度は20～70℃、好ましくは30～60℃であり、反応時間は0.1～40時間、

5 好ましくは1～24時間である。但し、これらの条件は使用する酵素量により影響を受ける。 $\beta$ -アミラーゼ処理後の液は、XAD (オルガノ株式会社) を担体として用いたカラムクロマトグラフィー処理により、一般式 (1) におけるmが2であるクロマノール配糖体が高純度で得られると同時に、一般式 (1) におけるmが1であるクロマノール配糖体  
10 も得られる。

一般式 (1) におけるmが3以上であるクロマノール配糖体を得る場合には、上記と同様の条件下で、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼによって得られる一般式 (1) におけるmが1から8位の混合物の形態を有するクロマノール配糖体を、HPLCを用いた分取クロ  
15 マトグラフィーなどで処理することにより、高純度のクロマノール配糖体 that 各m毎に得ることができる。

上記実施態様では2-置換アルコールにグルコース残基やマルトオリゴ糖残基を糖残基として結合させる場合の態様を記載したが、ガラクトース残基、マンノース残基、フルクトース残基等を糖残基として2-置換  
20 アルコールに結合させる場合は上記糖転位作用を触媒する酵素の項において説明した適切な酵素をそれぞれ使用する以外は上記実施態様と同様の操作を行うことによって、目的とするクロマノール配糖体が高純度で得られる (特開平9-249688号公報、特開平11-21291号公報)。

25 一方、本発明に用いられるクロマノール配糖体は、特願平10-75599号に記載の方法により、前記2-置換アルコールの6位の水酸基



を保護基で保護したもの（以下「糖受容体」という）とアノマー位に脱離基を導入し他の水酸基を保護基で保護した糖の誘導体（以下、「糖供与体」という）とを縮合反応させることによって製造できる（有機合成法）。

- 5 上記反応において使用される糖受容体の6位の水酸基を保護する保護基としては、アセチル基、ベンゾイル基、ピバロイル基、クロロアセチル基、レブリノイル基、ベンジル基、p-メトキシベンジル基、アリル基、t-ブチルジメチルシリル基、t-ブチルジフェニルシリル基、トリメチルシリル基およびトリチル基等が挙げられ、特にアセチル基およびベンゾイル基が好ましい。

- 上記反応において使用される糖供与体のアノマー位に導入される脱離基としては、塩素、臭素やフッ素等のハロゲン原子、チオメチル基、チオエチル基やチオフェニル基等の硫黄化合物およびトリクロロアセトイミド基などが挙げられ、特に臭素、塩素、チオメチル基、チオエチル基、
- 15 チオフェニル基およびトリクロロアセトイミド基が好ましい。また、アノマー位以外の水酸基を保護する保護基としては、アセチル基、ベンゾイル基、ピバロイル基、クロロアセチル基およびレブリノイル基等のアシル系保護基、およびベンジル基、p-メトキシベンジル基、アリル基、t-ブチルジメチルシリル基、t-ブチルジフェニルシリル基、トリメチルシリル基およびトリチル基等のエーテル系保護基が挙げられ、中でもアシル系保護基、特にアセチル基が好ましい。

これらの糖供与体は、周知の方法により糖の全ての水酸基へ保護基を導入し、次いでアノマー位を脱離基に置換することにより容易に調製することができる。

- 25 上記糖受容体と糖供与体の縮合反応について示せば、まず、糖受容体と糖供与体を非極性溶媒に溶解する。糖受容体と糖供与体の仕込量は、

糖受容体に対する糖供与体のモル比が1.0～1.5、好ましくは1.1～1.3がよい。非極性溶媒としては、塩化メチレン、ベンゼン等が挙げられる。

次に、無水条件下で活性化剤の存在下で糖供与体および糖受容体の縮  
5 合反応を行う。活性化剤としては、三フッ化ホウ酸・エーテル錯体、過  
塩素酸銀、トリフルオロメタンスルホン酸銀、臭化水銀、シアン化水銀、  
N-ヨードコハク酸イミド・トリフルオロメタンスルホン酸、ジメチル  
メチルチオスルホニウムトリフラート、p-トルエンスルホン酸等が挙  
げられ、特に、臭素を糖誘導体の脱離基として使用した場合には過塩素  
10 酸銀等の重金属塩を使用することが好ましい。反応温度は5～30℃、  
好ましくは10～25℃がよく、反応時間は12～48時間、好ましく  
は20～30時間がよい。

次いで得られた反応物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー等で精  
製し、保護基を水酸化ナトリウムおよびメタノール性塩酸等で脱保護す  
15 ることにより、2-(β-L-フコピラノシル)メチル-2,5,7,  
8-テトラメチルクロマン-6-オール、2-(α-L-ラムノピラノ  
シル)メチル-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-6-オール、  
2-(β-D-キシロピラノシル)メチル-2,5,7,8-テトラメ  
チルクロマン-6-オール等を得ることができる（特願平10-755  
20 99号）。

上記酵素法または有機合成法により得られたクロマノール配糖体は、  
一般的に、極めて高い水溶性（約100g/100ml）を有し、かつ  
油溶性にも富む（オクタノール/水系分配係数>3）両親媒性分子であ  
る。いいかえると、本発明によるクロマノール配糖体は、高い脂質親和  
25 性を備えた水溶性ビタミンEであるといえることができる。したがって、  
本発明によるクロマノール配糖体は、従来の水に不溶性あるいは貧溶性

のビタミンE誘導体とは異なり、水に溶解して使用しても高い脂質親和性を保つのできわめて優れた経皮吸収性を示し、細胞膜を透過しさらに細胞内にも入ることができる。これにより、生体内の抗酸化防御系を補強し、紫外線により皮膚表面および皮膚組織内において発生した活性酸素やフリーラジカルを効果的に消去するばかりでなく、かかる局所炎症において誘導されるサイトカインの産生をも有効に抑制して皮膚障害を予防し、または病態を飛躍的に改善する。また、皮膚内のコラーゲン等のマトリックス成分を合成する線維芽細胞を極めて効果的に活性化することができ、コラーゲンやヒアルロン酸等の代謝を活性化し、皮膚細胞の柔軟性、弾力性を改善するとともに、ターンオーバーを促進させ、伴い皮膚の色素沈着を抑制し皮膚の美白化をも促進する。さらに、上記反応により得られたクロマノール配糖体は、熱安定性、pH安定性、保存安定性に関してもトコフェロール、トロロックスまたは2-置換アルコールに比べて著しく向上するものである。

本発明の外用剤は、医薬用製剤または化粧品用製剤の態様で利用することができる。

本発明の皮膚外用剤を医薬用製剤として用いる場合、紫外線、熱、化学物質等のストレスにより生ずる皮膚炎症、日焼け、早期老化、皮膚癌、光線角化症等の予防および治療剤、皮膚色素沈着予防および改善剤、皮膚美白化剤、シワ、タルミ形成予防および改善剤、皮膚老化防止剤、皮膚細胞賦活剤等の皮膚障害予防および治療剤として利用することができる。この場合、ローション剤、懸濁剤、乳剤等の液状製剤、ゲル剤、クリーム剤、軟膏等の半固形製剤、散剤、粉剤もしくは用時溶解して塗布するための顆粒剤等の固形製剤として、標的部位およびその周辺部位に経皮的に投与できる。これらの好ましい製剤形態や投与形態等は、患者の年齢、性別、体質、症状、処置時期等に応じて、医師によって適宜選

扱われる。

また、本発明の皮膚外用剤を化粧料用製剤として用いる場合、液状、ペースト、ゲル、クリーム状等の半固形状または固形状の化粧料とすることができ、化粧水、ローション、乳液、クリーム、パック、洗浄料、ファンデーション、口紅、シャンプー、リンス、トリートメント等として利用することができる。

本発明の皮膚外用剤は、前記クロマノール配糖体と通常用いられる製剤成分または化粧料成分とを適宜配合して、常法により製造することができる。すなわち、精製水、リン酸緩衝液等の適当な緩衝液、生理的食塩水、リンゲル溶液、ロック溶液等の生理的塩類溶液、ラノリン、ミンク油、馬油、アーモンド油、ヒマシ油、ホホバ油、メドフォーム油、オリーブ油、ごま油、カカオバター等の動植物油、鉱油、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール、ミリスチン酸イソプロピル、パルミチン酸イソプロピル、イソオクタン酸セトステアリル、イソステアリン酸アルキルエステル等の合成油、コレステリン、ラノリンアルコール、フィトステロール等のステロール類およびそれらの誘導体、固形パラフィン、セレシン、鯨ロウ、ミツロウ、カルナウバロウ等のワックス類、流動パラフィン、スクアラン等の炭化水素油、ラウリン酸、ステアリン酸、オレイン酸等の高級脂肪酸類、エタノール等の低級アルコール類、ラウリルアルコール、セタノール、セトステアリルアルコール、オレイルアルコール等の高級アルコール類、グリセリン、ソルビット、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール等の多価アルコール類、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩、2-アルキル-N-カルボキシメチル-N-ヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタイン、N-ヤシ油脂肪酸アシル-L-グルタミン酸塩、ポリオキシエチレン高級アルコールエーテル、ポリオキシエチレン高級脂肪酸エステル、ポリ

オキシエチレン硬化ヒマシ油等の界面活性剤類、ヒアルロン酸塩、ピロリドンカルボン酸塩、加水分解コラーゲン液等の保湿剤、海藻エキス、カラギーナン、キサンタンガム、ポリビニルアルコール、カルボキシビニルポリマー等の増粘剤類、オキシ安息香酸アルキルエステル類、塩化セチルピリジニウム、塩化ベンザルコニウム、塩化アルキルトリメチルアンモニウム、フェノキシエタノール、トリクロサン、トリクロロカルバニリド、ジンクピリチオン等の防腐、殺菌剤、BHT、BHA、ビタミンA類、C類、E類およびそれらの誘導体等の酸化防止剤、ベンゾフェノン誘導体、パラアミノ安息香酸誘導体、メトキシケイ皮酸誘導体、ウロカニン酸等の紫外線吸収剤、カチオン化デキストラン等のカチオンリンス剤類、胎盤抽出物、鶏冠抽出物、アルニカエキス、アロエエキス、海藻エキス、カモミラエキス、カンゾウエキス、キナエキス、ニンニクエキス、メリッサエキス等の動・植物抽出エキス類、タルク、カオリン、マイカ、ベントナイト、雲母、雲母チタン、酸化チタン、ベンガラ、酸化鉄等の顔料、香料等を前記クロマノール配糖体と適宜組合せて、溶解、分散、乳化、混合等することにより、水溶液、非水溶液、懸濁液、リポソーム、エマルジョン等の液状、ペースト、ゲル、クリーム状等の半固形状または固形状の医薬用または化粧品用製剤とすることができる。

本発明の皮膚外用剤に含まれるクロマノール配糖体の濃度は、投与形態、疾病の種類や重篤度、目的とする投与量等によって様々であるが、一般的には原料の全質量に対して0.1～90質量%、好ましくは1～80質量%である。この際、クロマノール配糖体の濃度が前記上限値を超えると過剰な投与量に見合った皮膚細胞活性化の効果が得られず、前記下限値未満であるとかかる効果が十分に期待できずいずれも好ましくない。

本発明の皮膚外用剤の投与量は、患者の年齢、体重および症状、目的

とする投与形態や方法、治療効果、および処置期間等によって異なり、正確な量は医師により決定されるものであるが、通常、クロマノール配糖体として0.01～1000mg/kg体重/日の範囲になるように1日に1回から複数回に分けて投与される。

- 5 本発明の皮膚外用剤の皮膚障害予防および治療効果を、以下に述べる薬理試験により確認した。

なお、クロマノール配糖体として、下記の化合物を用いた。各化合物は、それぞれ各化合物名の後に確固書きで付記した文献に記載された方法に従って製造した。

- 10 TMG：2-( $\alpha$ -D-グルコピラノシル)メチル-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-6-オール(特開平7-118287号公報)  
TMGA：2-( $\beta$ -D-ガラクトピラノシル)メチル-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-6-オール(特開平9-249688号公報)  
15 TMFR：2-( $\beta$ -D-フルクトフラノシル)メチル-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-6-オール(特開平11-21291号公報)  
TMMA：2-( $\alpha$ -D-マンノピラノシル)メチル-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-6-オール(特開平11-21291号公報)。  
20

#### 紫外線(UVB)障害予防効果確認試験

エタノールを用いて1mM TMGを調整し、200nm～400nmの吸収スペクトルを測定した。得られたTMGの吸収スペクトルを図1に示す。

- 25 チャイニーズハムスター肺由来線維芽細胞(V79)または正常日本人皮膚由来2倍体線維芽細胞(NB1RGB)を細胞密度が $5.0 \times 1$

0<sup>4</sup>個/mlとなるように培地で調整し、96穴プレートの各ウェルに100μlずつ播種し、37℃、5%CO<sub>2</sub>雰囲気下で24時間培養を行った。培地としては、V79には10%牛胎仔血清含有のE-MEM培地（ニッスイ社製）、NB1RGBには10%牛胎仔血清含有のα-MEM培地（SIGMA社製）を用いた（以下これらを「通常培地」という）。

24時間後培地を除去し、各ウェルを200μlのHanks平衡塩類緩衝液（Hanks buffer）で2回洗浄した。そして、Hanks bufferのみをウェル当たり100μl加えたものをコントロール群とし、クロマノール配糖体の最終濃度が1mMとなるように溶解させたHanks bufferをウェル当たり100μl加えたものをクロマノール配糖体添加群とした。なお、1群を46とした。そして、紫外線ランプ（コスモバイオ製）を用いてUVB（312nm）を60mJ/cm<sup>2</sup>照射した。照射エネルギー量は紫外線強度計（トプコン社製、UVR-2）を用いて測定した。照射後直ちに各ウェルを200μlのHanks bufferで2回洗浄し、通常培地を各ウェルに100μl加え72時間培養を行った。72時間後、ニュートラルレッド試薬（0.015%）を各ウェルに100μl加え3時間培養した。3時間後培地を除去し、固定液（0.5%ホルムアルデヒド-0.1%塩化カルシウム水溶液）を各ウェルに200μl加え1分間の固定後、固定液を除去した。ついで、抽出液（50%エタノール-1%酢酸水溶液）を各ウェルに100μlずつ加え、20分間静置し、マイクロプレートリーダーで490nmの吸光度を測定し、細胞の生存数を算出した。これをもとに、紫外線無照射群の細胞数を100%としたときの相対生存率を求めた。得られた結果を表1に示す。

表 1

		生存率 (%)	
		V 7 9	N B 1 R G B
コントロール群		2 1 ± 6	4 5 ± 1 3
クロマノール 配糖体添加群	T M G	7 5 ± 8 *	7 8 ± 1 6 *
	T M G A	8 3 ± 7 *	8 3 ± 1 4 *
	T M F R	8 9 ± 9 *	8 1 ± 1 2 *
	T M M A	9 6 ± 9 *	7 9 ± 8 . 7 *

\* :  $P < 0.05$  (コントロール群と比較)

### 紫外線 (UVB) 誘導サイトカイン抑制効果確認試験

#### 1. 紫外線 (UVB) 障害予防効果試験法

- 5 正常ヒト新生児包皮表皮角化細胞 (凍結保存品、クラボウ社製) を細胞密度が  $1.0 \times 10^5$  個/ml となるように H u M e d i a - K G 2 培地 (クラボウ社製) で調整し、6 穴プレートの各ウェルに 2 ml ずつ播種し  $37^\circ\text{C}$ 、5 %  $\text{CO}_2$  雰囲気下で 24 時間培養を行なった。培養後
- 10 培地を除去し、各ウェルを 2 ml の H a n k s b u f f e r で 2 回洗浄した。H a n k s b u f f e r のみをウェル当たり 1 ml 加えたものをコントロール群とし、0.1 mM の被検物質を含む H a n k s b u f f e r をウェル当たり 1 ml 加えたものを被検物質添加群とした。なお、1 群を 8 とした。そして、紫外線ランプ (コスモバイオ製) を用いて UVB (312 nm) を  $30 \text{ mJ/cm}^2$  照射した。照射エネルギー
- 15 量は紫外線強度計 (トプコン社製、UVR-2) を用いて測定した。照射後直ちに各ウェルを 2 ml の H a n k s b u f f e r で 2 回洗浄



し、HuMedia-KG2培地を各ウェル当たり1ml加え、37℃、5%CO<sub>2</sub>雰囲気下において6時間培養した。

## 2. 紫外線（UVB）障害治療効果試験法

正常ヒト新生児包皮表皮角化細胞（凍結保存品、クラボウ社製）を細

- 5 胞密度が $1.0 \times 10^5$ 個/mlとなるようにHuMedia-KG2  
培地（クラボウ社製）で調整し、6穴プレートの各ウェルに2mlずつ  
播種し37℃、5%CO<sub>2</sub>雰囲気下で24時間培養を行った。培養後培  
地を除去し、各ウェルを2mlのHanks bufferで2回洗浄  
し、Hanks bufferのみをウェル当たり1ml加えた。そし  
10 て、紫外線ランプ（コスモバイオ製）を用いてUVB（312nm）を  
30mJ/cm<sup>2</sup>照射した。照射エネルギー量は紫外線強度計（トプコ  
ン社製、UVR-2）を用いて測定した。照射後直ちに各ウェルを2m  
lのHanks bufferで2回洗浄し、HuMedia-KG2  
培地のみをウェル当たり1ml加えたものをコントロール群とし、0.  
15 1mMの被検物質を含むHuMedia-KG2培地をウェル当たり1  
ml加えたものを被検物質添加群とした。なお、1群を8とした。そし  
て、37℃、5%CO<sub>2</sub>雰囲気下において6時間培養した。

## 3. インターロイキン-1 $\alpha$ （IL-1 $\alpha$ ）の測定

- 6時間培養後の上清を回収し、1000rpmで5分間遠心し、得ら  
20 れた上清中のIL-1 $\alpha$ の濃度を、ENDOGEN社製ELISAキッ  
トを用い定量した。なお、有意差検定はt-testで行い、それぞ  
れの未処理群に対して処理した。表2にIL-1 $\alpha$ の産生抑制効果試験の  
結果を示す。

表 2

	I L-1 $\alpha$ 産生量 ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	予防効果	治療効果
コントロール群	29.9 $\pm$ 6.2	28.9 $\pm$ 4.5
TMG	14.5 $\pm$ 3.5 *	18.5 $\pm$ 4.2 *
アスコルビオン酸	16.5 $\pm$ 2.8 *	31.7 $\pm$ 5.0
グルタチオン	7.2 $\pm$ 3.4 * *	36.5 $\pm$ 1.6

Means  $\pm$  S. E.

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  (いずれもコントロール群と比較)

図1より、クロマノール配糖体は310nm以上に吸収がほとんどないにもかかわらず、表1より明らかなように、UVB照射後の生存率を有意に向上させることができた。また、表2から明らかなように、クロマノール配糖体はアスコルビン酸やグルタチオンが紫外線により誘導されるIL- $\alpha$ の産生において、予防効果のみしか有しないのに対して、TMGは予防効果、治療効果共に有していることが認められ、TMGが皮膚における炎症性疾患の予防、治療に有効であることがわかった。

#### 10 紫外線誘導色素沈着改善効果確認試験

A-1系有色モルモット（雌性、7週齢）を1群6匹として、背部を剃毛し背部皮膚に紫外線（光源：キセノンランプ、照射量：2MED  $\times$  1分間）を1日1回、3～4日毎に計3回繰り返して照射し、色素沈着モデルを作製した。10日間放置後、色素沈着部の特定部位の皮膚明度（L値）を色差計を用いて測定した（前値）。その色素沈着部に、50%エタノール溶液を溶媒に用いて調整した5%TMG溶液（塗布量：

5.  $6 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) を1日2回、3週間連続して塗布し、これをTMG塗布群とした。また、5%TMG溶液の代わりに50%エタノール溶液を同様に塗布したものをコントロール群とした。塗布を開始して3週間後、背部皮膚の明度を色差計で測定し(後値)、 $\Delta L$ 値(前値-後値)を求めた。結果を表3に示す。

表3

	$\Delta L$ 値
TMG 塗布群	2.00
コントロール群	0.05

表4より明らかなように、紫外線により沈着した色素が、クロマノール配糖体の塗布により有意に淡色化されており、本発明の皮膚外用剤が、紫外線による色素沈着の改善作用を有することがわかった。

#### 細胞増殖促進効果確認試験

V79またはNB1RGBを細胞密度が $5 \times 10^4$ 個/ $\text{ml}$ となるように培地で調整した。ついで、96穴プレートの各ウェルに $100 \mu\text{l}$ ずつ播種し、 $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 雰囲気下で72時間培養を行った。培地は、通常培地を用いた。 $100 \mu\text{M}$ クロマノール配糖体含有の通常培地で培養した群をクロマノール配糖体添加群とし、通常培地で培養した群をコントロール群とした。なお、1群を80とした。72時間後、ニュートラルレッド試薬(0.015%)を各ウェルに $100 \mu\text{l}$ 加え3時間培養した。3時間後培地を除去し、固定液(0.5%ホルムアルデヒド-0.1%塩化カルシウム水溶液)を各ウェルに $200 \mu\text{l}$ 加え1分間の固定後、固定液を除去した。ついで抽出液(50%エタノール-

1 %酢酸水溶液)を各ウェルに100 $\mu$ lずつ加え、20分間静置し、マイクロプレートリーダーで490nmの吸光度を測定して、細胞数を算出した。これをもとに、コントロール群の細胞数を100%としたときの相対増殖率を求めた。得られた結果を表3に示す。

5

表4

		増殖率 (%)	
		V 7 9	N B 1 R G B
コントロール群		1 0 0	1 0 0
クロマノール 配糖体添加群	T M G	1 1 2	1 1 8
	T M G A	1 1 5	1 2 1
	T M F R	1 2 6	1 1 5
	T M M A	1 2 4	1 2 1

表4より明らかなように、クロマノール配糖体添加による細胞増殖が有意に認められ、本発明の皮膚外用剤は、細胞活性化作用を有することがわかった。

10

#### 急性毒性試験

本発明の皮膚外用剤について急性毒性試験を行い、その安全性を確認した。4～5週令のICR系マウスを1群3匹として用い、クロマノール配糖体として上記と同じTMGを5%アラビアゴム液に懸濁した後、

TMG換算で500mg/kgを経口投与して1週間観察した。この際、

対照群として5%アラビアゴム液を0.3ml経口投与した。その結果、

いずれの投与群においてもマウスの死亡例は認められなかった。

15

製造例 1

TMG 1 g、エタノール 3 g、ヒドロキシエチルセルロース 0.2 g およびパラオキシ安息香酸メチル 0.1 g を精製水 100 ml に混合溶解してローション剤を得た。

5 製造例 2

TMG 2 g、流動パラフィン 6 g、ミツロウ 2 g、自己乳化型モノステアリン酸グリセリド 3 g および白色ワセリン 5 g を加温して溶解、分散させ、軟膏剤を得た。

製造例 3

- 10 TMG 2 g を、モノステアリン酸グリセリド 2 g、ステアリルアルコール 4 g、オクチルドデカノール 2 g およびモノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン 5 g に加温しながら分散させ、これにパラオキシ安息香酸メチル 0.1 g、グリセリン 5 g 及び精製水 60 g を加温して溶解させたものを加え、高速攪拌により乳化、冷却し、クリーム剤を得た。

15 製造例 4

TMG 2 g、エタノール 5 g、1,3-ブチレングリコール 5 g および香料 0.05 g を精製水 100 g に混合溶解して化粧水を得た。

## 産業上の利用可能性

- 20 上述したように、本発明の皮膚外用剤は、水溶性で優れた抗酸化活性を有するクロマノール配糖体を有効成分とするので、紫外線により皮膚表面および皮膚組織内において発生した活性酸素やフリーラジカルを効果的に消去して、皮膚障害を抑制し、病態を飛躍的に改善することができる。

- 25 また、本発明の皮膚外用剤は、紫外線による局所炎症において誘導されるサイトカインの産生をも有効に抑制して皮膚炎症の拡大を抑制する

ことができる。

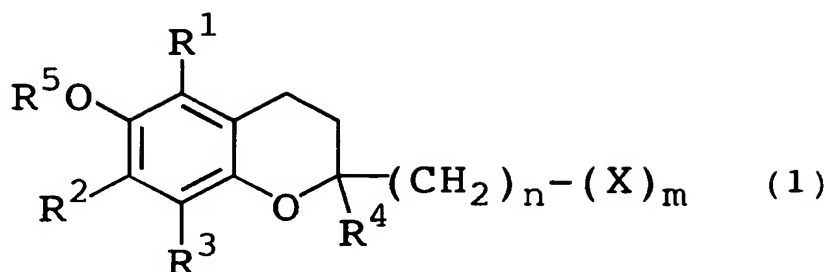
さらに、本発明の皮膚外用剤は、皮膚内のコラーゲン等のマトリックス成分を合成する線維芽細胞を極めて効果的に活性化することができ、コラーゲンやヒアルロン酸等の代謝を活性化し、皮膚細胞の柔軟性、弾力性を改善するとともに、ターンオーバーを促進させ、伴い皮膚の色素沈着を抑制し皮膚の美白化をも促進することができる。

本発明の皮膚外用剤は、高い水溶性を有するクロマノール配糖体を有効成分とするので、有効成分を高濃度で含有する水性製剤とすることができ、保存安定性が高い。しかも、経皮吸収性に優れるので、外用剤として患部に経皮的に投与でき、少用量で患部に効果的に作用し、皮膚障害を予防、治療することができるとともに、副作用を伴わないので極めて安全に使用することができる。

したがって、本発明の皮膚外用剤は、紫外線障害予防および治療剤、皮膚色素沈着予防および改善剤、皮膚美白化剤、皮膚老化防止剤または細胞賦活剤等の皮膚障害予防および治療剤や化粧品として用いた場合極めて有用である。

## 請求の範囲

## 1. 下記一般式(1)



5 (ただし、式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$  および  $R^4$  は同一または異なる水素原子または低級アルキル基を表し、 $R^5$  は水素原子、低級アルキル基または低級アシル基を表し、 $X$  は糖残基中の水酸基の水素原子が低級アルキル基または低級アシル基で置換されていてもよい単糖残基またはオリゴ糖残基を表し、 $n$  は 0 ～ 6 の整数であり、および  $m$  は

10 1 ～ 6 の整数である) で表されるクロマノール配糖体を含む皮膚外用剤。

2. 前記クロマノール配糖体は 2 - ( $\alpha$ -D-グルコピラノシル) メチル-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-6-オール、2 - ( $\beta$ -D-ガラクトピラノシル) メチル-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-6-オール、2 - ( $\beta$ -D-フルクトフラノシル) メチル-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-6-オールまたは 2 - ( $\alpha$ -D-マンノピラノシル) メチル-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-6-オールである請求の範囲第 1 項に記載の皮膚外用剤。

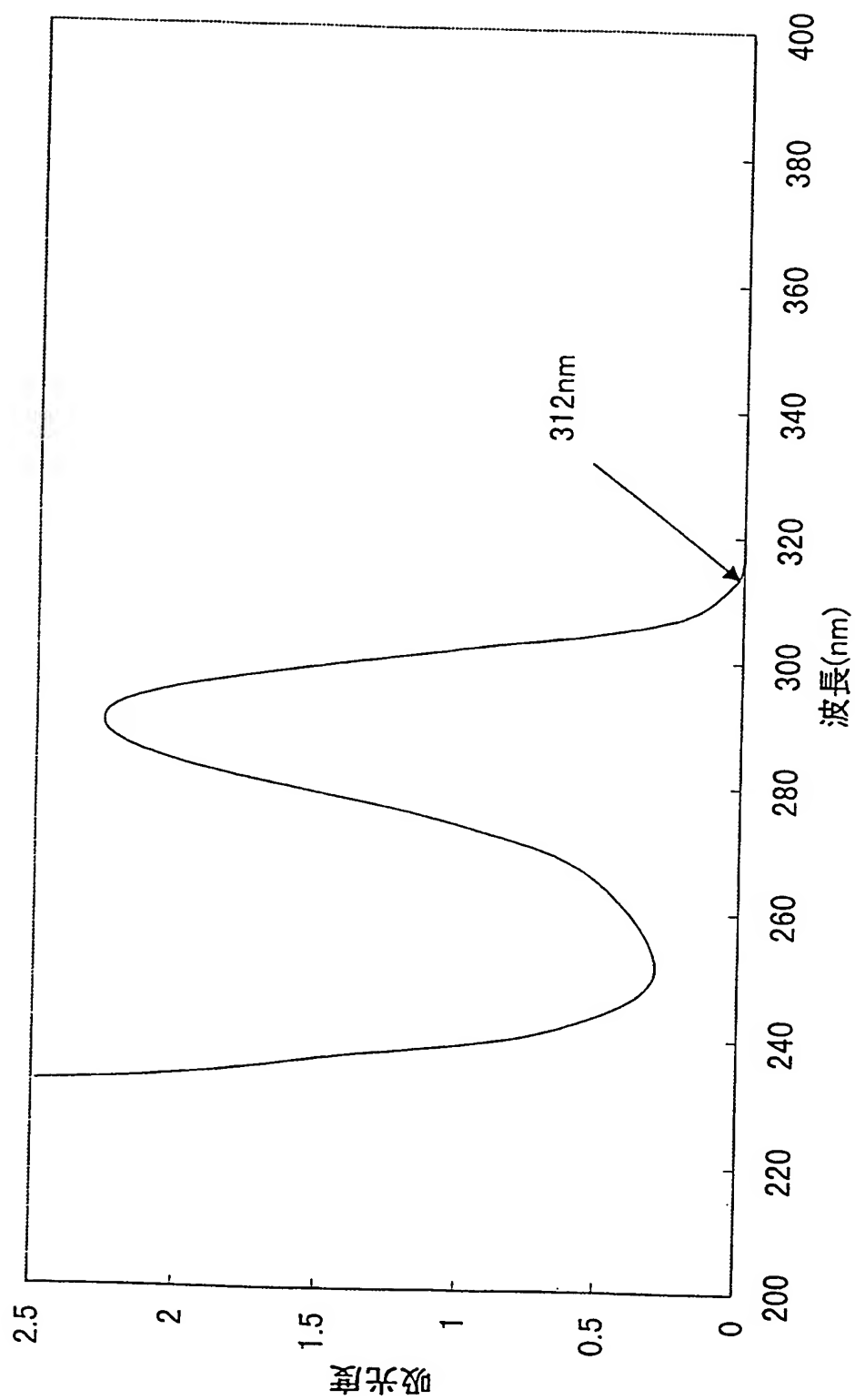
20 3. 水性製剤である請求の範囲第 1 または 2 項に記載の皮膚外用剤。

4. 皮膚障害予防および治療剤である請求の範囲第 1 ～ 3 項に記載の皮膚外用剤。

5. 紫外線障害予防および治療剤、皮膚色素沈着予防および改善剤、皮膚美白化剤、皮膚老化防止剤または細胞賦活剤である請求の範囲第4項に記載の皮膚外用剤。
6. 化粧品である請求の範囲第1～3項に記載の皮膚外用剤。



図 1



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02034

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K31/7048, A61K7/42, A61K7/48, A61P17/00,  
A61P43/00 // C07H15/26, C07H17/065

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K31/7048, A61K7/00-7/50, A61P17/00,  
A61P43/00, C07H15/26, C07H17/065

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA (STN), CAPLUS (STN), CAOLD (STN), REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	EP, 611152, A1 (CCI CORPOLATION), 17 August, 1994 (17.08.94) & JP, 7-118287, A & US, 5478812, A & US, 5889164, A	1-3, 6 1-6
Y	US, 5780445, A (BEIERSDORF AKTIENGESELLSCHAFT), 14 July, 1998 (14.07.98) & JP, 9-67401, A & EP, 726273, A1 & DE, 19504398, A1	1-6
A	JP, 10-72356, A (CCI Corporation), 17 March, 1998 (17.03.98) (Family: none)	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
20 June, 2000 (20.06.00)

Date of mailing of the international search report  
27 June, 2000 (27.06.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/02034

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>7</sup> A61K31/7048, A61K7/42, A61K7/48, A61P17/00,  
A61P43/00 // C07H15/26, C07H17/065

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>7</sup> A61K31/7048, A61K7/00-7/50, A61P17/00,  
A61P43/00, C07H15/26, C07H17/065

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), CAPLUS (STN), CAOLD (STN), REGISTRY (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	EP, 611152, A1 (CCI CORPOLATION) 17. 8月. 1994 (17. 08. 94) & JP, 7-118287, A & US, 5478812, A & US, 5889164, A	1-3, 6 1-6
Y	US, 5780445, A (BEIERSDORF AKTIENGESELLSCHAFT) 14. 7月 1998 (14. 07. 98) & JP, 9-67401, A & EP, 726273, A1 & DE, 19504398, A1	1-6
A	JP, 10-72356, A (シーシーアイ株式会社) 17. 3月. 1998 (17. 03. 98) (ファミリーなし)	1-6

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20. 06. 00

国際調査報告の発送日

27.06.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

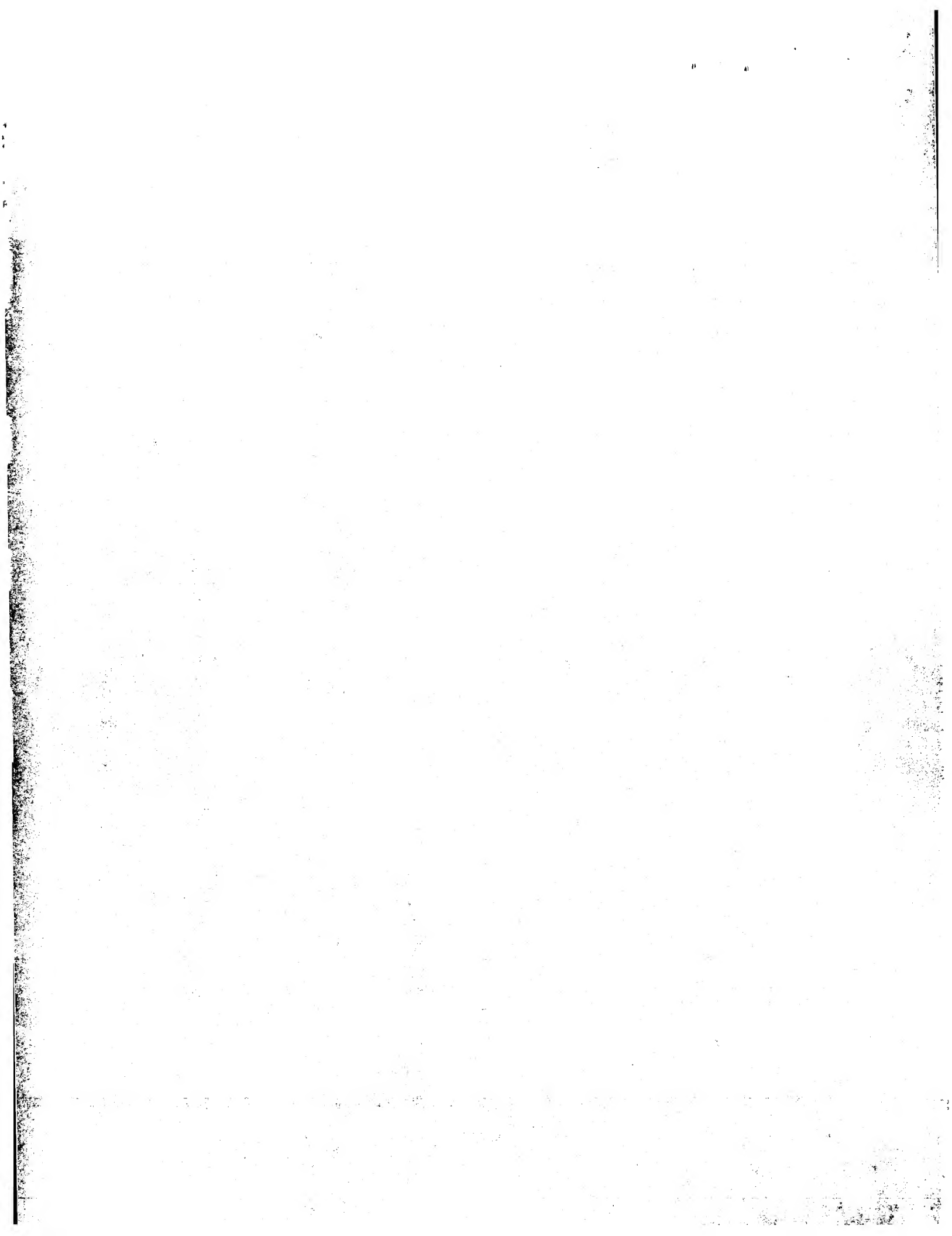
特許庁審査官 (権限のある職員)

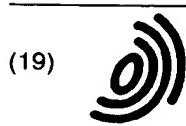
中木 亜希

4 P

9282

電話番号 03-3581-1101 内線 3492





Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



(11) **EP 1 174 140 A1**

(12) **EUROPEAN PATENT APPLICATION**  
published in accordance with Art. 158(3) EPC

(43) Date of publication:  
23.01.2002 Bulletin 2002/04

(21) Application number: 00912985.9

(22) Date of filing: 30.03.2000

(51) Int Cl.7: **A61K 31/7048**, A61K 7/42,  
A61K 7/48, A61P 17/00,  
A61P 43/00  
// (C07H15/26, 17:065)

(86) International application number:  
**PCT/JP00/02034**

(87) International publication number:  
**WO 00/57889 (05.10.2000 Gazette 2000/40)**

(84) Designated Contracting States:  
**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU  
MC NL PT SE**

(30) Priority: 31.03.1999 JP 9387499  
31.01.2000 JP 2000022596

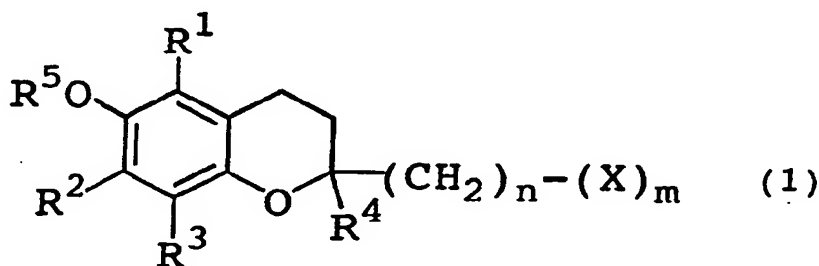
(71) Applicant: **CCI CORPORATION**  
Seki-shi, Gifu 501-3923 (JP)

(72) Inventors:  
• **MURASE, Hironobu**  
Gifu-shi, Gifu 502-0071 (JP)  
• **FUJII, Toshiaki**  
Minokamo-shi, Gifu 505-0051 (JP)

(74) Representative: **Ashmead, Richard John et al**  
**KILBURN & STRODE 20 Red Lion Street**  
London WC1R 2PJ (GB)

(54) **SKIN PREPARATIONS FOR EXTERNAL USE**

(57) An dermatological agent for external use is disclosed which contains a chromanol glycoside represented by the following general formula (1)



(wherein R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, and R<sup>4</sup>, which may be the same or different, each represent a hydrogen atom or a lower alkyl group, R<sup>5</sup> represents a hydrogen atom, a lower alkyl group, or a lower acyl group, X represents a monosaccharic residue or an oligosaccharic residue optionally having the hydrogen atom of the hydroxyl group in the saccharic residue substituted with a lower alkyl group or a lower acyl group, n represents an integer in the range of 0 - 6, and m represents an integer in the range of 1 - 6). This is a novel dermatological agent for external use which excels in stability and percutaneous absorbency, manifests an effective action safely at a small application rate, and effectively prevents and cures the dermatopathy. It is very useful as an agent for preventing and curing the disorders caused by the ultraviolet light, an agent for preventing and allaying the sedimentation of pigment in the skin, an agent for beautifying the skin in white, an agent for preventing the senescence of the skin, an agent for activating cells, an agent for preventing and curing the dermatopathy, and a cosmetic preparation.

EP 1 174 140 A1

**D scription**

## Technical Field

**[0001]** This invention relates to a novel dermatological agent for external use. More particularly, this invention relates to a dermatological agent for external use having a water-soluble chromanol glycoside as an effective component thereof.

## Background Art

**[0002]** The skin is susceptible of various forms of stress such as ultraviolet light, heat, and chemical substances which exist in the environment because it is situated in the outermost surface of the human body. Among other forms of stress mentioned above, the ultraviolet light (particularly the UVB having a wavelength region of 290 - 320 nm) is reputed to generate active oxygen and free radicals on the skin surface and in the cutaneous tissues and form the cause for sunburn and cutaneous cancer ("Active Oxygen and Morbidity" compiled and written by Masayasu Inoue and published by Gakkai Shuppan Center on October 1, 1992, pp. 567-576). Particularly, since the amount of the ultraviolet light that reaches the surface of the earth in consequence of the fracture in the ozonosphere has been continuing to increase in recent years, the protection of the skin with the ultraviolet absorber is no longer satisfactory and the necessity for eliminating the active oxygen and free radicals which have been generated as within the cutaneous tissues has been gaining in importance. Further, it has recently come to light that the cytokine, an inflammatory chemical mediator, is derived by an ultraviolet light and that this mediator incites derivation of such immunocytes as leukocytes and consequently gives rise to a local inflammatory reaction and exerts heavy damage on the skin (Thomas S. Kupper etc.: J. Clin. Invest.: Vol. 80, August 1987, 430 - 436). As the substances that inhibit the manifestation of the cytokine, such steroids as corticosteroid have been known. They are known to possess an effect of repressing immunity and, therefore, incite such harmful side effects as wasting syndrome, diabetes, and osteoporosis. As a result, the desirability of developing a substance which, in the case of a local inflammation of the skin caused by the ultraviolet light, is capable of effectively eliminating the active oxygen and free radicals responsible for the disease and also inhibiting the occurrence of the cytokine which would be otherwise derived has been finding a growing public recognition.

**[0003]** It has further come to light that when the skin is exposed all at once to the stress generated in a large amount as by ultraviolet light, heat, or a chemical substance, this stress entails a decline in the division potential of epidermal basal cells and cutaneous fibroblasts besides inducing the local inflammation mentioned above. It is, therefore, inferred that in consequence of this decline of the division potential, the skin as a whole not only succumbs to atrophy but also induces a decrease or alteration in the natural moisture retaining component and the intercellular matrix component produced by the epidermal cells and brings about acceleration of cutaneous senescence manifested in the increase of stains and freckles and the formation of wrinkles and skin blemishes. Thus, attempts have been made to activate the metabolism of collagen and hyaluronic acid with a view to improving the cutaneous cells in flexibility and resilience and to promote turnover with a view to repressing the deposition of pigment in the skin and promoting the beautification of the skin in white by activating the fibroblasts which synthesize such a matrix component as collagen in the skin. As the substances that activate cutaneous cells and prevent them against senescence, vitamin C, vitamin E, retinoic acid, and retinol derivatives have been known. These substances invariably have a dubious quality in stability, percutaneous absorbency, and teratogenicity and, as such, find utility in an extremely limited range.

**[0004]** The chromanol glycoside which is used in this invention is a known compound (JP-A-07-118, 287, JP-A-09-249,688, and JP-A-11-21,291). The chromanol glycoside is obtained by substituting an alcohol for the phytyl group at the 2 position of the chroman ring of  $\alpha$ -tocopherol which is a typical vitamin E and further linking a saccharum to the alcohol. It possesses high solubility in water and excellent resistance to oxidation. It has never been known, however, to utilize the chromanol glycoside mentioned above for the prevention of such cutaneous disorders as described above and as dermatological agent for external uses as curing agents and cosmetic articles.

**[0005]** This invention, initiated in view of the problematic points incurred by the prior art as described above, has as an object thereof the provision of a novel dermatological agent for external use which is capable of effectively acting to repress and cure the dermatopathy caused as by the ultraviolet light, for example, at a small application rate without entailing any side effect.

**[0006]** Another object of this invention is to provide a novel dermatological agent for external use which is capable of effectively eliminating the active oxygen and free radicals forming the cause for the local cutaneous inflammation due to the ultraviolet light and, at the same time, repressing the production of a cytokine to be derived therefrom.

**[0007]** A further object of this invention is to provide a novel dermatological agent for external use which is capable of preventing improving the deposition of pigment in the skin by the ultraviolet light and exhibiting an excellent beautification in white.

**[0008]** Still another object of this invention is to provide a novel dermatological agent for external use which is capable

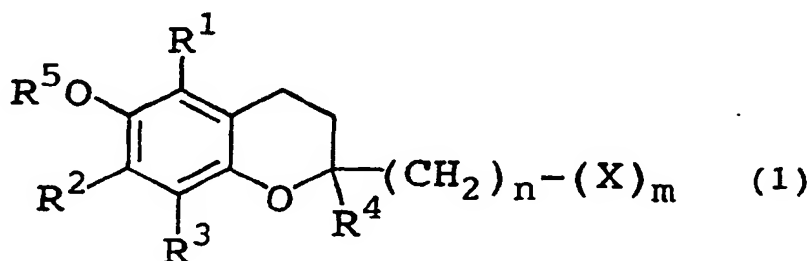
of activating the cutaneous cells and preventing the cutaneous senescence.

[0009] Yet another object of this invention is to provide a novel dermatological agent for external use which can be obtained as an aqueous preparation containing the active component at a high concentration and which excels in stability and percutaneous absorbency.

#### Disclosure of the Invention

[0010] The present inventors, after pursuing a diligent study in search of a way of preventing and curing the dermatopathy caused by the ultraviolet light, for example, have found that the chromanol glycoside mentioned above is capable of repressing and curing the dermatopathy unusually effectively. This invention has been perfected as a result.

[0011] Specifically, this invention concerns a dermatological agent for external use formed by containing a chromanol glycoside represented by the following general formula (1)



(wherein R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, and R<sup>4</sup>, which may be the same or different, each represent a hydrogen atom or a lower alkyl group, R<sup>5</sup> represents a hydrogen atom, a lower alkyl group, or a lower acyl group, X represents a monosaccharic residue or an oligosaccharic residue optionally having the hydrogen atom of the hydroxyl group in the saccharic residue substituted with a lower alkyl group or a lower acyl group, n represents an integer in the range of 0 - 6, and m represents an integer in the range of 1 - 6).

[0012] This invention also concerns the dermatological agent for external use mentioned above, wherein the chromanol glycoside mentioned above is 2-(α-D-glucopyranocyl)methyl-2,5,7,8-tetramethyl chroman-6-ol, 2-(β-D-galactopyranocyl)methyl-2,5,7,8-tetramethyl chroman-6-ol, 2-(β-D-fructofuranosyl)methyl-2,5,7,8-tetramethyl chroman-6-ol, or 2-(α-D-mannopyranosyl)methyl-2,5,7,8-tetramethyl chroman-6-ol.

[0013] This invention further concerns the dermatological agent for external use mentioned above, which is an aqueous preparation.

[0014] This invention further concerns the dermatological agent for external use mentioned above, which is an agent for preventing and curing dermatopathy.

[0015] This invention further concerns the dermatological agent for external use mentioned above, which is an agent for preventing and curing disorders caused by the ultraviolet light, an agent for preventing and improving deposition of pigment in the skin, an agent for beautifying the skin in white, an agent for preventing the skin from senescence, and an agent for activating the cells.

[0016] This invention further concerns the dermatological agent for external use, which is a cosmetic article.

#### Brief Description of the Drawing

[0017] Fig. 1 is a graph of the ultraviolet spectrum determined by dispersing TMG in an absorption spectrum in the region of 200 nm - 400 nm.

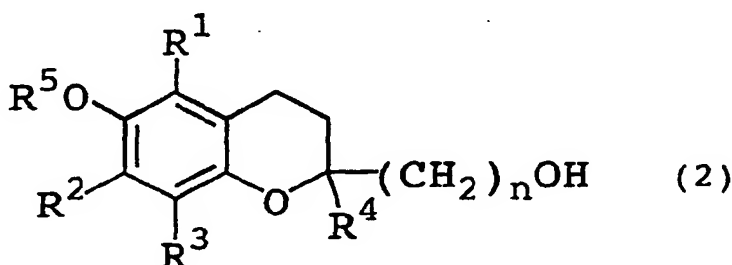
#### Best Mode of Embodying this Invention.

[0018] The dermatological agent for external use of this invention is characterized by having the chromanol glycoside represented by the general formula (1) mentioned above as an effective component.

[0019] The lower alkyl groups represented by R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, and R<sup>5</sup> in the general formula (1) mentioned above are favorably lower alkyl groups of 1 - 8 carbon atoms, preferably 1 - 6 carbon atoms. As concrete examples of these lower alkyl groups, methyl group, ethyl group, propyl group, isopropyl group, butyl group, pentyl group, isopentyl group, hexyl group, heptyl group, and octyl group may be cited. Among other lower alkyl groups mentioned above, methyl group or ethyl group proves particularly advantageous. The lower acyl groups represented by R<sup>5</sup> are favorably lower acyl groups of 1 - 8 carbon atoms, preferably 1 - 6 carbon atoms. As concrete examples of these lower acyl groups,

formyl group, acetyl group, propionyl group, butyryl group, isobutyryl group, valeryl group, isovaleryl group, pivaloyl group, hexanoyl group, heptanoyl group, and octanoyl group may be cited. Among other lower acyl groups mentioned above, acetyl group, propionyl group, or butyryl group prove particularly advantageous. As concrete examples of the monosaccharic residue represented by X, such saccharic residues as glucose, galactose, fucose, xylose, mannose, rhamnose, fructose, arabinose, lyxose, ribose, allose, altrose, idose, talose, deoxyribose, 2-deoxyribose, quinovose, and abequeose may be cited. As concrete examples of the oligosaccharic residue represented by X, such saccharic residues as maltose, lactose, cellobiose, raffinose, xylobiose, and sucrose which have linked thereto two to four monosaccharides may be cited. Among other saccharic residues mentioned above, such monosaccharic residues as glucose, galactose, fucose, xylose, rhamnose, mannose, and fructose prove particularly favorable. The hydrogen atom of the hydroxyl group in the saccharic residue represented by X may be substituted with a lower alkyl group, preferably a lower alkyl group of 1 - 8 carbon atoms, or a lower acyl group, preferably a lower acyl group of 1 - 10 carbon atoms. Then, n represents an integer in the range of 0 - 6, preferably 1 - 4 and m represents an integer in the range of 1-6, preferably 1-3. As preferred concrete examples of the chromanol glycosides represented by the general formula (1), 2-( $\alpha$ -D-glucopyranosyl)methyl-2,5,7,8-tetramethyl chroman-6-ol, 2-( $\beta$ -D-galactopyranosyl)methyl-2,5,7,8-tetramethyl chroman-6-ol, 2-( $\beta$ -L-fucopyranosyl)methyl-2,5,7,8-tetramethyl chroman-6-ol, 2-( $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl)methyl-2,5,7,8-tetramethyl chroman-6-ol, 2-( $\beta$ -D-xylopyranosyl)methyl-2,5,7,8-tetramethyl chroman-6-ol, 2-( $\beta$ -D-glucopyranosyl)methyl-2,5,7,8-tetramethyl chroman-6-ol, 2-( $\beta$ -D-fructofuranosyl)methyl-2,5,7,8-tetramethyl chroman-6-ol, and 2-( $\alpha$ -D-mannopyranosyl)methyl-2,5,7,8-tetramethyl chroman-6-ol may be cited.

**[0020]** The chromanol glycoside to be used in this invention is produced by the enzyme reaction which comprises causing a 2-substituted alcohol represented by the following general formula (2);



(wherein R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> and n have the same meanings as defined above) to react with an oligosaccharide in the presence of an enzyme catalyzing a corresponding transglycosidating action thereby linking a specific hydroxyl group of saccharide to the hydroxyl group at the 2 position of the 2-substituted alcohol (enzymatic method).

**[0021]** The 2-substituted alcohol represented by the general formula (2) that is used as one of the raw materials in the reaction mentioned above (hereinafter referred to simply as "2-substituted alcohol") is a known substance and it can be obtained by the method disclosed in JP-B-01-43,755 and JP-B-01-49,135. The 2-substituted alcohol which answers the general formula (2) with methyl group for each of R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, and R<sup>4</sup>, hydrogen atom for R<sup>5</sup> and 1 for n, for example, can be easily obtained as by subjecting 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chroman-2-carboxylic acid (sold under the trademark designation of "Trolox") having such a structure as has the phytyl group at the 2 position of the chroman ring in  $\alpha$ -tocopherol substituted with a carboxyl group to a thermal refluxing treatment in diethyl ether in the presence of hydrogenated lithium aluminum.

**[0022]** The enzyme to be used in the aforementioned reaction for the sake of catalyzing the transglycosidating action is favorably adopted as properly varied with the kind of a saccharide to be used in the reaction.

(1) In the case of linking a glucose residue to a 2-substituted alcohol with an  $\alpha$ -bond:

(a) The maltooligosaccharides at the maltose to the maltotetraose position are preferred to be acted on by  $\alpha$ -glucosidase, EC3.2.1.20. The  $\alpha$ -glucosidase from any of substantially all origins can be effectively used for the relevant reaction. As concrete examples of the  $\alpha$ -glucosidase, the  $\alpha$ -glucosidase originating in *Saccharomyces* sp. produced by Toyo Spinning Co., Ltd., the  $\alpha$ -glucosidase originating in *Saccharomyces cerevisiae* produced by Oriental Kobo Kogyo K.K., the  $\alpha$ -glucosidase originating in *Aspergillus niger* produced by Amano Seiyaku K.K., the  $\alpha$ -glucosidase originating in *Saccharomyces* sp. produced by Wako Pure Chemical Industries, Ltd., the  $\alpha$ -glucosidase originating in Bakers yeast produced by SIGMA, and the  $\alpha$ -glucosidase originating in genus *Bacillus* may be cited.

(b) The soluble starch or the starch is preferred to be acted on by 4- $\alpha$ -glucano-transferase, EC 2.4.1.25.



(2) In the case of linking a glucose residue or a maltooligosaccharic residue to a 2-substituted alcohol with an  $\alpha$ -bond:

The maltooligosaccharide, soluble starch, starch, or cyclodextrin ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) is preferred to be acted on by cyclodextrin glucanotransferase, EC 2.4.1.19. As typical concrete examples of the cyclodextrin glucanotransferase, the cyclodextrin glucanotransferase originating in *Bacillus macerans* produced by Amano Seiyaku K.K., the cyclodextrin glucanotransferase originating in *Bacillus stearothermophilus* produced by Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyusho K.K., and the cyclodextrin glucanotransferases originating in *Bacillus megaterium* and *Bacillus circulans* ATCC 9995 may be cited.

(3) In the case of linking a glucose residue to a 2-substituted alcohol with a  $\beta$ -bond:

(a) The oligosaccharide formed of such a  $\beta$ -bond as cellobiose, curdlan, or laminaran is preferred to be acted on by  $\beta$ -glucosidase, EC 3.2.1.21.

(b) The cellobiose in the presence of phosphoric acid is preferred to be acted on by cellobiose phosphorylase, EC 2.4.1.20.

(4) In the case of linking galactose residue to a 2-substituted alcohol with an  $\alpha$ -bond:

The melibiose or the raffinose is preferred to be acted on by  $\alpha$ -galactosidase, EC 3.2.1.22.

(5) In the case of linking a galactose residue to a 2-substituted alcohol with a  $\beta$ -bond:

(a) The lactose or the like is preferred to be acted on by  $\beta$ -galactosidase, EC 3.2.1.23.

(b) The arabinogalactan or the like is preferred to be acted on by endo-1,4- $\beta$ -galactanase, EC 3.2.1.89.

(6) In the case of linking a fructose residue to a 2-substituted alcohol with a  $\beta$ -bond:

(a) The sucrose, raffinose, melibiose, or the like is preferred to be acted on by levansucrase, EC 2.4.1.10.

(b) The sucrose is preferred to be acted on by  $\beta$ -fructofuranosidase, EC 3.2.1.26.

(c) The inulin or the like is preferred to be acted on by inulin fructotransferase, EC 2.4.1.93.

**[0023]** The reaction conditions in the reaction mentioned above are variable with the kinds of chromanol glycoside and enzyme to be used therein. When a chromanol glycoside answering the general formula (1) with 1 for m is synthesized by using  $\alpha$ -glucosidase, for example, the 2-substitute alcohol is preferred to be dissolved in a sugar solution. For this purpose, addition of an organic solvent is favorable. As concrete examples of the organic solvent, dimethyl sulfoxide, N,N-dimethyl formamide, methanol, ethanol, acetone, and acetonitrile may be cited. Among other organic solvents mentioned above, dimethyl sulfoxide and N,N-dimethyl formamide are used particularly advantageously in consideration of their ability to improve the  $\alpha$ -glucosidase in the transferring activity. The concentration of the organic solvent at the time of the addition is in the range of 1 - 50 (v/v) %. When the efficiency of the reaction is taken into consideration, the concentration is preferred to be in the range of 5 - 35 (v/v) %.

**[0024]** The 2-substituted alcohol in the reaction solution is preferred to have a saturated concentration or a concentration approximating closely thereto. The kind of sugar to be favorably used is a low molecular sugar on the order of maltose through maltotetraose, preferably maltose. The concentration of the sugar is in the range of 1 - 70 (mass/volume)%, preferably 30 - 60 (mass/volume)%. The pH value is in the range of 4.5 - 7.5, preferably of 5.0 - 6.5. The reaction temperature is in the range of 10 - 70°C, preferably 30 - 60°C. Of course, these conditions are affected by the amount of the enzyme to be used, for example. After the reaction is completed, the chromanol glycoside aimed at by the reaction is obtained in high purity by subjecting the reaction solution to column chromatography using a substance (made by Japan Organo Co., Ltd. and sold under the trademark designation of "XAD") as a carrier.

**[0025]** When a chromanol glycoside answering the general formula (1) with 1 for m is synthesized by the use of cyclodextrin glucanotransferase, for example, the relevant reaction prefers the 2-substituted alcohol to be dissolved in a sugar solution. For the sake of this solution, addition of an organic solvent proves favorable. As concrete examples of the organic solvent, dimethyl sulfoxide, N,N-dimethylformamide, methanol, ethanol, acetone, and acetonitrile may be cited. The concentration of the organic solvent at the time of addition is in the range of 1 - 50 (vol/vol) % and preferably 5-35 (vol/vol) % in consideration of the efficiency of reaction. The 2-substituted alcohol in the reaction solution is preferred to have a saturated concentration or a concentration approximating closely thereto.

**[0026]** As concrete examples of the kind of sugar which is preferably used in the reaction mentioned above, maltooligosaccharides having a polymerization degree higher than maltotriose; soluble starch, starch, and cyclodextrin ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) may be cited. The concentration of the sugar is in the range of 1 - 70 (mass/volume) %, preferably in the range of 5 - 50 (mass/volume) %. The pH value is in the range of 4.5 - 8.5, preferably in the range of 5.0 - 7.5. The reaction temperature is in the range of 10 - 70°C, preferably in the range of 30 - 60°C. The reaction time is in the range of 1 - 60 hours, preferably in the range of 2 - 50 hours. These reaction conditions are affected by the amount of an enzyme

to be used. The chromanol glycosides which are obtained by these reactions turn out to be mixtures answering the general formula (1) with an integer in the range of 1 to 8 for m. Then, by treating such a mixture by the use of glucoamylase (EC 3.2.1.3), it is made possible to obtain exclusively a chromanol glycoside answering the general formula (2) with 1 for m. In this case, the reaction temperature is in the range of 20 - 70°C, preferably in the range of 30 - 60°C and the reaction time is in the range of 0.1 - 40 hours, preferably in the range of 1 - 24 hours. Only, these conditions are affected by the amount of an enzyme to be used. Then, by subjecting the liquid resulting from the aforementioned treatment with glucoamylase to column chromatography using a substance (made by Japan Organo Co., Ltd. and sold under the trademark designation of "XAD") as a carrier, it is made possible to obtain a chromanol glycoside answering the general formula (1) with 1 for m in high purity.

**[0027]** In obtaining a chromanol glycoside answering the general formula (1) with 2 for m, by causing  $\beta$ -amylase (EC 3.2.1.2) to act on chromanol glycosides having the form of a mixture answering the general formula (1) with integers 1 to 8 for m which are obtained with cyclo-dextrin glucanotransferase under the same conditions as mentioned above, it is made possible to obtain exclusively a chromanol glycoside answering the general formula (1) with 1 or 2 for m. At this time, the reaction temperature is in the range of 20 - 70°C, preferably in the range of 30 - 60°C and the reaction time is in the range of 0.1 - 40 hours, preferably in the range of 1 - 24 hours. Only, these conditions are affected by the amount of an enzyme to be used. By subjecting the liquid resulting from the treatment with  $\beta$ -amylase to column chromatography using a substance (made by Japan Organo Co., Ltd. and sold under the trademark designation of "XAD") as a carrier, it is made possible to obtain a chromanol glycoside answering the general formula (1) with 2 for m in high purity and to obtain a chromanol glycoside answering the general formula (1) with 1 for m as well.

**[0028]** In obtaining chromanol glycosides answering the general formula (1) with integers of not less than 3 for m, by subjecting chromanol glycosides obtained with cyclodextrin glucano-transferase and having the form of a mixture answering the general formula (1) with integers 1 to 8 for m to fractionation chromatography using HPLC, for example, it is made possible to obtain chromanol glycosides of high purity respectively for the integers of m.

**[0029]** The modes of embodiment described above have depicted the cases of linking a glucose residue or a maltooligosaccharide residue as a sugar residue to the 2-substituted alcohol. In the case of linking a galactose residue, mannose residue, or fructose residue as a sugar residue to the 2-substituted alcohol, by following the procedure of the mode of embodiment described above while using a proper enzyme mentioned already in the paragraph dealing with enzymes capable of catalyzing the sugar transferring action, it is made possible to obtain the target chromanol glycoside in high purity (JP-A-09-249,688 and JP-A-11-21,291).

**[0030]** The chromanol glycoside to be used in this invention may be also produced by subjecting the aforementioned 2-substituted alcohol having the hydroxyl group at the 6 position thereof protected with a protection group (hereinafter referred to as "sugar acceptor") and a sugar derivative having a leaving group introduced to the anomer position thereof and another hydroxyl group thereof protected with a protection group (hereinafter referred to as "sugar donor") to a condensation reaction in accordance with the method disclosed in JP-B-10-75,599 (method of organic synthesis).

**[0031]** As concrete examples of the protection group serving the purpose of protecting the hydroxyl group at the 6 position of the sugar acceptor to be used in the reaction mentioned above, acetyl group, benzoyl group, pivaloyl group, chloroacetyl group, levulinoyl group, benzyl group, p-methoxybenzyl group, allyl group, t-butyldimethylsilyl group, t-butyldiphenylsilyl group, trimethylsilyl group, and trityl group may be cited. Among other protection groups mentioned above, acetyl group and benzoyl group prove particularly advantageous.

**[0032]** As concrete examples of leaving group to be introduced to the anomer position of the sugar donor for use in the reaction mentioned above, halogen atoms such as chlorine, bromine, and fluorine, sulfur compounds such as thiomethyl group, thioethyl group, and thiophenyl group, and trichloroacetoimide group may be cited. Among other leaving groups mentioned above, bromine, chlorine, thiomethyl group, thioethyl group, thiophenyl group, and trichloroacetoimide group prove particularly advantageous. As concrete examples of the protection group serving the purpose of protecting the hydroxyl group at a position other than the anomer position, acyl type protection groups such as acetyl group, benzoyl group, pivaloyl group, chloroacetyl group, and levulinoyl group and ether type protection groups such as benzyl group, p-methoxybenzyl group, allyl group, t-butyldimethylsilyl group, t-butyldiphenylsilyl group, trimethylsilyl group, and trityl group may be cited. Among other protection groups mentioned above, acyl type protection groups, particularly acetyl group, prove particularly favorable.

**[0033]** These sugar donors can be easily prepared by introducing a protection group into any of the relevant hydroxyl groups by the universally known method and then substituting the atom or group at the anomer position with a leaving group.

**[0034]** To illustrate the condensation reaction between the sugar acceptor and the sugar donor mentioned above, the reaction is started with the action of solving the sugar acceptor and the sugar donor in a non-polar solvent. The amounts of the sugar acceptor and the sugar donor necessary for charging the relevant reaction vessel are properly to be such that the molar ratio of the sugar acceptor to the sugar donor falls in the range of 1.0 - 1.5, preferably in the range of 1.1 - 1.3. As concrete examples of the non-polar solvent, methylene chloride and benzene may be cited.

**[0035]** Then, the sugar donor and the sugar acceptor are subjected to a condensation reaction under the anhydrous

condition in the presence of an activating agent. As concrete examples of this activating agent, trifluoroboric acid-ether complex, silver perchlorate, silver trifluoromethane sulfonate, mercury bromide, mercury cyanide, N-iodosuccinic acid imide-trifluoromethane sulfonic acid, dimethylmethylthiosulfonium trifurate, and p-toluene sulfonic acid may be cited. When bromine is adopted as the leaving group of the sugar derivative in particular, it is advantageous to use such a heavy metal salt as silver perchlorate. The reaction temperature is in the range of 5 - 30°C, preferably in the range of 10 - 25°C and the reaction time is in the range of 12 - 48 hours, preferably in the range of 20 - 30 hours.

**[0036]** Then, by purifying the resultant reaction product as by silica gel column chromatography and depriving the purified reaction product of the protection group as with sodium hydroxide and methanolic hydrochloric acid, it is made possible to obtain

2-( $\beta$ -L-fucopyranosyl)methyl-2,5,7,8-tetramethyl chroman-6-ol,  
2-( $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl)methyl-2,5,7,8-tetramethyl chroman-6-ol,  
2-( $\beta$ -D-xylopyranosyl)methyl-2,5,7,8-tetramethyl chroman-6-ol, etc. (JP-B-10-75,599).

**[0037]** The chromanol glycoside which is obtained by the enzyme method or the method of organic synthesis mentioned above is generally an amphiphilic molecule which possesses extremely high water solubility (about 100 g/100 ml) and abounds in oil solubility. In other words, the chromanol glycoside according to this invention may well be called a water soluble vitamin E endowed with high affinity for lipids. Thus, the chromanol glycoside according to this invention, unlike the conventional vitamin E derivatives which are insoluble or sparingly soluble in water, retains the high affinity for lipids even when used as dissolved in water and, therefore, exhibits veritably excellent percutaneous absorbency, permeates cell membranes, and further infiltrates the cells. As a result, it prevents the dermatopathy or rapidly ameliorates the morbidity by reinforcing the antioxidation preventive system in the living body, effectively eliminating the active oxygen and free radicals generated on the surface and in the tissue of the skin by the ultraviolet light, and effectively repressing the production of the cytokine possibly induced in the site of local inflammation as well. Since the chromanol glycoside is capable of activating very effectively the fibroblast that synthesizes such a matrix component as the collagen in the skin, it serves the purpose of activating the metabolism of collagen and hyaluronic acid, enhancing the flexibility and elasticity of the cutaneous cells, and accelerating the turnover, with the result that the sedimentation of pigment in the skin will be repressed and the beautification of the skin in white will be promoted. Further, the chromanol glycoside which is obtained by the reaction mentioned above is prominently improved also in thermal stability, pH stability, and stability of preservation as compared with tocopherol, Trolox®, and 2-substituted alcohol.

**[0038]** The external agent of this invention can be utilized in the form of a pharmaceutical preparation or a cosmetic preparation.

**[0039]** For application to pharmaceutical preparations, the dermatological agent for external use of this invention can be used as agents for preventing and curing cutaneous inflammation, sunburn, early senescence, cutaneous cancer, and keratosis caused by the stress of ultraviolet light, heat, and chemical substance, an agent for preventing and allaying sedimentation of pigment in the skin, an agent for beautification of the skin in white, an agent for preventing and allaying the formation of wrinkles and sags, an agent for preventing cutaneous senescence, and an agent for preventing and curing the dermatopathy such as an agent for activating cutaneous cells. In this case, this dermatological agent for external use can be percutaneously administered to target sites or cites in the proximity thereof in the form of a liquid preparation such as lotion, suspension, or emulsion, in the form of a semi-solid preparation such as gel, cream, or ointment, or in the form of a solid preparation such as powder, dust, or granule transformed to a solution prior to use by application to a surface. The form of preparation and the mode of administration mentioned above may be properly selected by physicians in charge of relevant treatments so as to suit the age, sexuality, constitution, symptom, and time of treatment of each of the patients.

**[0040]** For application to cosmetic preparations, the dermatological agent for external use of this invention can be manufactured into cosmetic articles of such semi-solid to solid state as liquid, paste, gel, and cream and can be utilized specifically as cosmetic liquid, lotion, emulsion, cream, pack, cleanser, foundation, lip stick, shampoo, rinse, and treatment.

**[0041]** The dermatological agent for external use of this invention can be produced in accordance with the customary procedure which comprises properly combining the chromanol glycoside mentioned above with pharmaceutical components or cosmetic components in popular use. Specifically, pharmaceutical or cosmetic preparations in such liquid forms as aqueous solution, non-aqueous solution, suspension, ribosome, and emulsion and in such semi-solid or solid forms as paste, gel, and cream can be produced by suitably combining the chromanol glycoside mentioned above with buffers such as purified water and phosphate buffer, physiological salt solutions such as physiological saline solution, Ringer's solution, and Locke's solution, animal and plant oils such as lanolin, mink oil, horse oil, almond oil, castor oil, jojoba oil, meadow-foam oil, olive oil, sesame oil, and coconut butter, mineral oil, synthetic oils such as polyoxyethylene polyoxypropylene glycol, isopropyl myristate, isopropyl palmitate, cetostearyl isooctanate, and alkyl esters of isostearic acid, sterols such as cholesterol, lanolin alcohol, and phytosterol and derivatives thereof, waxes such as solid paraffin, ceresin, spermatic wax, bees wax, and carnauba wax, hydrocarbon oils such as liquid paraffin and squalane, higher fatty acids such as lauric acid, stearic acid, and oleic acid, lower alcohols such as ethanol, higher alcohols lauryl alcohol,

cetanol, cetostearyl alcohol, and oleyl alcohol, polyhydric alcohols such as glycerin, sorbit, propylene glycol, and 1,3-butylene glycol, surfactants such as sulfates of polyoxyethylene alkyl ethers, 2-alkyl-N-carboxymethyl-N-hydroxyethyl imidazolinium betaine, acyl-L-glutamates of -coconut oil fatty acid, higher alcohol ethers of polyoxyethylene, and castor oil cured with polyoxyethylene, moisture retaining agents such as hyaluronates, pyrrolidone carboxylates, and hydrolyzed collagen solution, bodying agents such as seaweed extract, carageenan, xanthan gum, polyvinyl alcohol, and carboxyl vinyl polymers, antiseptic-bactericidal agents such as alkyl esters of oxybenzoic acid, cetylpyridinium chloride, benzalkonium chloride, alkyltrimethyl ammonium chlorides, phenoxy ethanol, triclosan, trichlorocarbanilidem, and zinc pyrithion, anti-oxidizing agents such as BHT, BHA, vitamins of A series, C series, E series, and derivatives, ultraviolet absorbents such as benzophenone derivatives, paraaminobenzoic acid derivatives, methoxy cinnamic acid derivatives, and urocanic acid, cation rinsing agents such as cationized dextran, animal plant extracts such as placenta extract, cock's comb extract, arnica extract, aloe extract, seaweed extract, camomile extract, licorice extract, cinchona extract, garlic extract, and melissa extract, and pigments and perfumes such as talc, kaolin, mica, bentonite, titanium mica, titanium oxide, iron oxide red, and iron oxide, and subjecting the resultant mixtures to solution, dispersion, emulsion, and intermixing.

**[0042]** Though the concentration of the chromanol glycoside contained in the dermatological agent for external use of this invention is variable with the mode of administration, the kind and seriousness of a disease, and the dosage aimed at, it is generally in the range of 0.1 - 90 mass %, preferably in the range of 1 - 80 mass %, based on the total mass of the raw materials involved. If the concentration of the chromanol glycoside exceeds the upper limit of the range mentioned above, the excess will be at a disadvantage in failing to bring the proportionate addition to the effect of activating the cutaneous cells. If the concentration falls short of the lower limit of the range, the shortage will be likewise at a disadvantage in failing to bring the effect sufficiently.

**[0043]** The dosage of the dermatological agent for external use of this invention varies with the age, body weight, and symptom of a patient, the mode of administration aimed at, the effect of cure, and the duration of treatment and ought to be accurately determined by a physician. The dosage as reduced to the content of chromanol glycoside is generally in the range of 0.01 - 1000 mg/kg of body weight/day. This dosage is given to a patient wholly once or several times as split into as many portions daily.

**[0044]** The dermatological agent for external use of this invention was assayed for the effect of preventing and curing dermatopathy by the pharmacological test which will be described below.

**[0045]** As the chromanol glycoside, the following compounds were used. These compounds were produced by the methods described in the specific pieces of literature indicated in the parentheses following the respective names of the compounds

TMG:

2-( $\alpha$ -D-Glucopyranosyl)methyl-2,5,7,8-tetramethyl chroman-6-ol (JP-A-07-118,287)

TMGA:

2-( $\beta$ -D-Galactopyranosyl)methyl-2,5,7,8-tetramethyl chroman-6-ol (JP-A-09-249,688)

TMFR:

2-( $\beta$ -D-Fructofuranosyl)methyl-2,5,7,8-tetramethyl chroman-6-ol (JP-A-11-21,291)

TMMA:

2-( $\alpha$ -D-Mannopyranosyl)methyl-2,5,7,8-tetramethyl chroman-6-ol (JP-A-11-21,291)

#### Test for confirming effect of preventing ultraviolet light (UVB) disorder

**[0046]** A 1 mM TMG was prepared with ethanol and assayed for absorption spectrum of 200 nm - 400 nm. The absorption spectrum of TMG consequently obtained is shown in Fig. 1.

**[0047]** The fibroblasts originating in the lungs of Chinese hamster (V79) or the diploid fibroblasts originating in the skin of a normal Japanese person (NB1 RGB) were adjusted in a culture medium till the cell density reached  $5.0 \times 10^4$  pieces/ml, sown at a rate of 100  $\mu$ l in each of the wells on a 96-hole plate, and cultured in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> kept at 37°C for 24 hours. As the culture medium, an E-MEM medium containing 10% bovine fetus serum (made by Nissui K.K.) For V79 or an  $\alpha$ -MEM medium (made by SIGMA) for NB1 RGB (hereinafter each referred to as "ordinary culture medium").

**[0048]** After 24 hours' culture, the culture medium was removed and the individual wells were each washed twice with 200  $\mu$ l of Hanks equilibrium salt buffer (Hanks buffer). Some of these wells to which the Hanks buffer alone was added in a unit amount of 100  $\mu$ l formed a control group and the remainders of them to which the Hanks buffer having a given chromanol glycoside dissolved till a final concentration of 1 mM was added in a unit amount of 100  $\mu$ l formed a chromanol glycoside-added group. The groups each consisted of 46 samples. They were irradiated with a UVB (312 nm) emitted from an ultraviolet lamp (made by Cosmo Bio K.K.) at a dosage of 60 mJ/cm<sup>2</sup>. The amount of the energy so emitted was measured by the use of an ultraviolet light intensity meter (made by Topcon K.K. and sold under the

product code of "UVR-2").

**[0049]** Immediately after completion of the irradiation, the wells were each washed twice with 200  $\mu$ l. With the ordinary culture medium added in a unit volume of 100  $\mu$ l to the wells, the contents of the wells were cultured for 72 hours. After the elapse of 72 hours from thence, the neutral red reagent (0.015%) was added in a unit volume of 100  $\mu$ l to the wells and the resultant contents of the wells were cultured for 3 hours. After the elapse of 3 hours from thence, the culture medium was removed and a fixing solution (aqueous solution containing 0.5% of formaldehyde and 0.1% of calcium chloride) was added in a unit volume of 200  $\mu$ l to the wells. The resultant contents of the wells were fixed for one minute and the fixing solution was removed from the wells. Then, an extracting solution (aqueous solution containing 50% of ethanol and 1% of acetic acid) were added in a unit volume of 100  $\mu$ l to the wells. The resultant contents of the wells were left standing for 20 minutes and assayed with a micro-plate reader for the absorbency at 490 nm and visually examined to count the number of live cells. On the basis of the results of the assay, the relative survival ratios of the samples were determined, with the number of cells in the groups of wells not irradiated with the ultraviolet light taken as 100%. The results are shown in Table 1.

Table 1

		Survival ratio (%)	
		V79	NB1RGB
Control group		21 $\pm$ 6	45 $\pm$ 13
Chromanol glycoside -added group	TMG	75 $\pm$ 8*	78 $\pm$ 16*
	TMGA	83 $\pm$ 7*	83 $\pm$ 14*
	TMFR	89 $\pm$ 9*	81 $\pm$ 12*
	TMMA	96 $\pm$ 9*	79 $\pm$ 8.7*

\*: P < 0.05 (As compared with control group)

#### Test for confirming effect of repressing ultraviolet light (UVB)-induced cytokine

##### 1. Method for testing effect of preventing ultraviolet light (UVB)-induced cytokine

**[0050]** Cornified cells of normal human neonate foreskin scurf skin (freeze-preserved product, made by Kurabo K.K.) were adjusted to a cell density of  $1.0 \times 10^5$  pieces/ml in a HuMedia-KG2 culture medium (made by Kurabo K.K.), sown in a unit volume of 2 ml in the component wells of a 6-hole plate, and cultured in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C for 24 hours. After completion of the culture, the culture medium was removed and the wells were each washed twice with 2 ml of Hanks buffer. Some of these wells to which the Hanks buffer alone was added in a unit amount of 1 ml formed a control group and the remainders of them to which the Hanks buffer containing 0.1 mM of a given sample was added in a unit amount of 1 ml formed a sample-added group. The groups each consisted of 8 samples. They were irradiated with a UVB (312 nm) emitted from an ultraviolet lamp (made by Cosmo Bio K.K.) at a dosage of 30 mJ/cm<sup>2</sup>. The amount of the energy so emitted was measured by the use of an ultraviolet light intensity meter (made by Topcon K.K. and sold under the trademark designation of "UVR-2").

**[0051]** Immediately after completion of the irradiation, the wells were each washed twice with 2 ml of Hanks buffer. With a HuMedia-KG2 culture medium added in a unit volume of 1 ml to the wells, the contents of the wells were cultured in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C for 6 hours.

##### 2. Method for testing effect of curing ultraviolet light (UVB) disorder

**[0052]** Cornified cells of normal human neonate foreskin scurf skin (freeze-preserved product, made by Kurabo K.K.) were adjusted to a cell density of  $1.0 \times 10^5$  pieces/ml in a HuMedia-KG2 culture medium (made by Kurabo K.K.), sown in a unit volume of 2 ml in the component wells of a 6-hole plate, and cultured in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C for 24 hours. After completion of the culture, the culture medium was removed and the wells were each washed twice with 2 ml of Hanks buffer. The Hanks buffer alone was added in a unit volume of 1 ml to the wells. They were irradiated with a UVB (312 nm) emitted from an ultraviolet lamp (made by Cosmo Bio K.K.) at a dosage of 30 mJ/cm<sup>2</sup>.

## EP 1 174 140 A1

The amount of the energy so emitted was measured by the use of an ultraviolet light intensity meter (made by Topcon K.K. and sold under the trademark designation of "UVR-2"). Some of these wells to which the Hanks buffer alone was added in a unit amount of 1 ml formed a control group and the remainders of them to which the Hanks buffer containing 0.1 mM of a given sample was added in a unit amount of 1 ml formed a sample-added group. The groups each consisted of 8 samples. The contents of the wells were cultured in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C for 6 hours.

### 3. Determination of interleukin-1 $\alpha$ (IL-1 $\alpha$ )

[0053] The supernatant occurring at the end of 6 hours' culture was recovered and centrifuged at 1000 rpm for 5 minutes. The concentration of the IL-1 $\alpha$  in the resultant supernatant was determined by the use of an ELISA kit made by ENDOGENE Corp. The significance was verified by the t-test and was applied to the groups yet to be treated. Table 2 shows the results of the test for the effect of repressing the production of IL-1 $\alpha$ .

Table 2

	Amount of IL-1 $\alpha$ produced ( $\mu$ g/ml)	
	Effect of prevention	Effect of curing
Control group	29.9 $\pm$ 6.2	28.9 $\pm$ 4.5
TMG	14.5 $\pm$ 3.5*	18.5 $\pm$ 4.2*
Ascorbic acid	16.5 $\pm$ 2.8*	31.7 $\pm$ 5.0
Glutathione	7.2 $\pm$ 3.4**	36.5 $\pm$ 1.6

Means  $\pm$  S.E.

\*: p < 0.05, \*\*: p < 0.01 (invariably as compared with the control group)

[0054] Though the chromanol glycoside showed practically no absorption above 310 nm as noted from Fig. 1, it significantly improved the survival ratio after irradiation with UVB as shown in Table 1. It is also clear from Table 2 that the chromanol glycoside manifested only the preventing effect in the production of IL- $\alpha$  capable of allowing induction of ascorbic acid and glutathione by virtue of the ultraviolet light but that the TMG was confirmed to combine this effect with the curing effect and prove effective in preventing and curing the inflammatory disease on the skin.

### Test for confirming improving effect relative to deposition of ultraviolet light-induced pigment

[0055] Pigment-sedimented models were produced from AI-1 type colored guinea pigs (female, 7-week old) divided into groups of 6 heads by shaving their backs and performing the irradiation of the skins of the backs with the ultraviolet light (light source: xenon lamp, dose: 2 MED  $\times$  1 minute) once daily up to a total of three repetitions three to four days apart. After the models had been left standing for 10 days from thence, the specific portions of the pigment-sedimented parts were measured for the brightness of skin (L value) by the use of a colorimeter (former value). To the pigment-sedimented parts, a 5% TMG solution adjusted by using a 50% ethanol solution as a solvent was applied twice daily continuously for three weeks (amount applied: 5.6  $\mu$ l/cm<sup>2</sup>). The guinea pigs which had undergone this application formed a TMG-applied group. The guinea pigs which had undergone application of a 50% ethanol solution in the place of the 5% TMG solution formed a control group. After three weeks from the start of the application, the skins of their backs were measured for the brightness with a colorimeter (latter value) to find the  $\Delta$ L value (former value - latter value). The results are shown in Table 3.

Table 3

	$\Delta$ L value
TMG-applied group	2.00

Table 3 (continued)

	$\Delta L$ value
Control group	0.05

[0056] It is clearly noted from Table 4 that the pigment sedimented by the ultraviolet light was lightened significantly by the application of chromanol glycoside and that the dermatological agent for external use of this invention possessed of the action of allaying the sedimentation of pigment by the ultraviolet light.

#### Test for confirming effect of promoting growth of cells

[0057] V79 or NB1RGB was adjusted with a culture medium till the cell density reached  $5 \times 10^4$  pieces/ml. Then, it was sown in a unit volume of 100  $\mu$ l in the component wells of a 96-hole plate and cultured in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C for 72 hours. The culture medium used herein was the ordinary culture medium. Some of the wells effecting culture in the ordinary culture medium containing 100  $\mu$ M of chromanol glycoside formed a chromanol glycoside-added group and the remainders of the wells effecting culture in the ordinary culture medium formed a control group. The groups each consisted of 80 samples. After the elapse of 72 hours from thence, a neutral red reagent (0.015%) was added in a unit volume of 100  $\mu$ l to the wells and the resultant contents of the wells were cultured for 3 hours. After the 3 hours' culture, the culture medium was removed and a fixing solution (aqueous solution containing 0.5% of formaldehyde and 0.1% of calcium chloride) was added in a unit volume of 200  $\mu$ l to the wells. The resultant contents of the wells were left fixing for one minute and then the fixing solution was removed. Subsequently, an extraction solution (aqueous solution containing 50% of ethanol and 1% of acetic acid) was added in a unit volume of 100  $\mu$ l to the wells. The resultant contents of the wells were left standing for 20 minutes and measured for absorbency at 490 nm by the use of a micro-plate reader so as to allow computation of the number of cells. On the basis of the results of the measurement, the relative breeding ratios of the samples were determined, with the number of cells in the control groups taken as 100%. The results are shown in Table 3.

Table 4

		Breeding ratio (%)	
		V79	NB1RGB
Control group		100	100
Chromanol glycoside -added group	TMG	112	118
	TMGA	115	121
	TMFR	126	115
	TMMA	124	121

[0058] It is clearly noted from Table 4 that the addition of the chromanol glycoside brought a significantly discernible growth of cells and that the dermatological agent for external use of this invention was possessed of the action of activating cells.

#### Test for acute toxicity

[0059] The dermatological agent for external use of this invention was tested for acute toxicity so as to establish the safety thereof. ICR type mice 4 - 5 weeks old were divided into groups each of three heads. The same TMG as mentioned above was suspended as a chromanol glycoside in a 5% gum arabic solution. The suspension was orally administered to the mice at a unit dosage of 500 mg/kg as reduced to TMG and the mice were kept under observation for one week. To the mice in the control group, a 5% gum arabic solution was orally administered in a unit volume of 0.3 ml. No fatality was found in any of the mice in the administration group.

Production Example 1

[0060] A lotion was obtained by mixing 1 g of TMG, 3 g of ethanol, 0.2 g of hydroxyethyl cellulose, and 0.1 g of methyl paraoxybenzoate in 100 ml of purified water till dissolution.

Production Example 2

[0061] An ointment was obtained by heating 2 g of TMG, 6 g of liquid paraffin, 2 g of bees wax, 3 g of a self-emulsion type monostearic acid glyceride, and 5 g of white soft paraffin till they were dissolved and dispersed..

Production Example 3

[0062] A cosmetic cream was obtained by thermally dispersing 2 g of TMG, 2 g of monostearic acid glyceride, 4 g of stearyl alcohol, 2 g of octyl dodecanol, and 5 g of monooleic acid polyoxyethylene sorbitan and subjecting the resultant dispersion together with a solution obtained by thermally dissolving 0.1 g of methyl paraoxybenzoate, 5 g of glycerin, and 60 g of purified water to emulsification by high-speed agitation, and cooling the produced mixture.

Production Example 4

[0063] A toilet lotion was obtained by mixing 2 g of TMG, 5 g of ethanol, 5 g of 1,3-butylene glycol, and 0.05 g of perfume in 100 g of purified water till dissolution.

Industrial Applicability

[0064] The dermatological agent for external use of this invention has as an active component thereof a chromanol glycoside which exhibits solubility in water and possesses an excellent activity to resist oxidation as described above. It is therefore capable of effectively eliminating active oxygen and free radicals generated by the ultraviolet light on the surface of the skin and in the tissue of the skin, repressing the dermatopathy, and allowing rapid amelioration of the morbidity.

[0065] The dermatological agent for external use of this invention is further capable of curbing the spread of the cutaneous inflammation by effectively repressing the production of cytokine induced by the ultraviolet light in the local site of inflammation.

[0066] Further the dermatological agent for external use of this invention is capable of allowing unusually effective activation of the fibroblast which synthesizes such a matrix component as collagen in the skin, activating the metabolism of collagen and hyaluronic acid, enhancing the flexibility and elasticity of the cutaneous cells, promoting the phenomenon of turnover, repressing the sedimentation of pigment in the skin, and promoting the beautification of the skin in white.

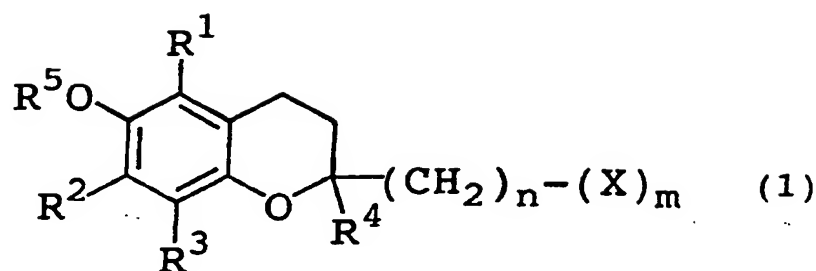
[0067] Since the dermatological agent for external use of this invention has as an active component thereof a chromanol glycoside abounding in solubility in water, it can be formulated as an aqueous pharmaceutical preparation which contains the active component in a high concentration and enjoys high stability of preservation. Moreover, since this agent excels in the percutaneous absorbency, it is capable of being percutaneously administered as an external medicine to the affected region, effectively acting on the seat of disease even at a small application rate, preventing and curing the dermatopathy, and warranting exceptionally safe use on account of the absence of a side effect.

[0068] The dermatological agent for external use of this invention, therefore, is exceptionally advantageous when it is used as an agent for preventing and curing disorders caused by the ultraviolet light, an agent for preventing and allaying the sedimentation of pigment in the skin, an agent for beautifying the skin in white, an agent for preventing the senescence of the skin, an agent for preventing and curing the dermatopathy as by activating cells, and a cosmetic preparation.

**Claims**

1. A dermatological agent for external use containing a chromanol glycoside represented by the following general formula (1)

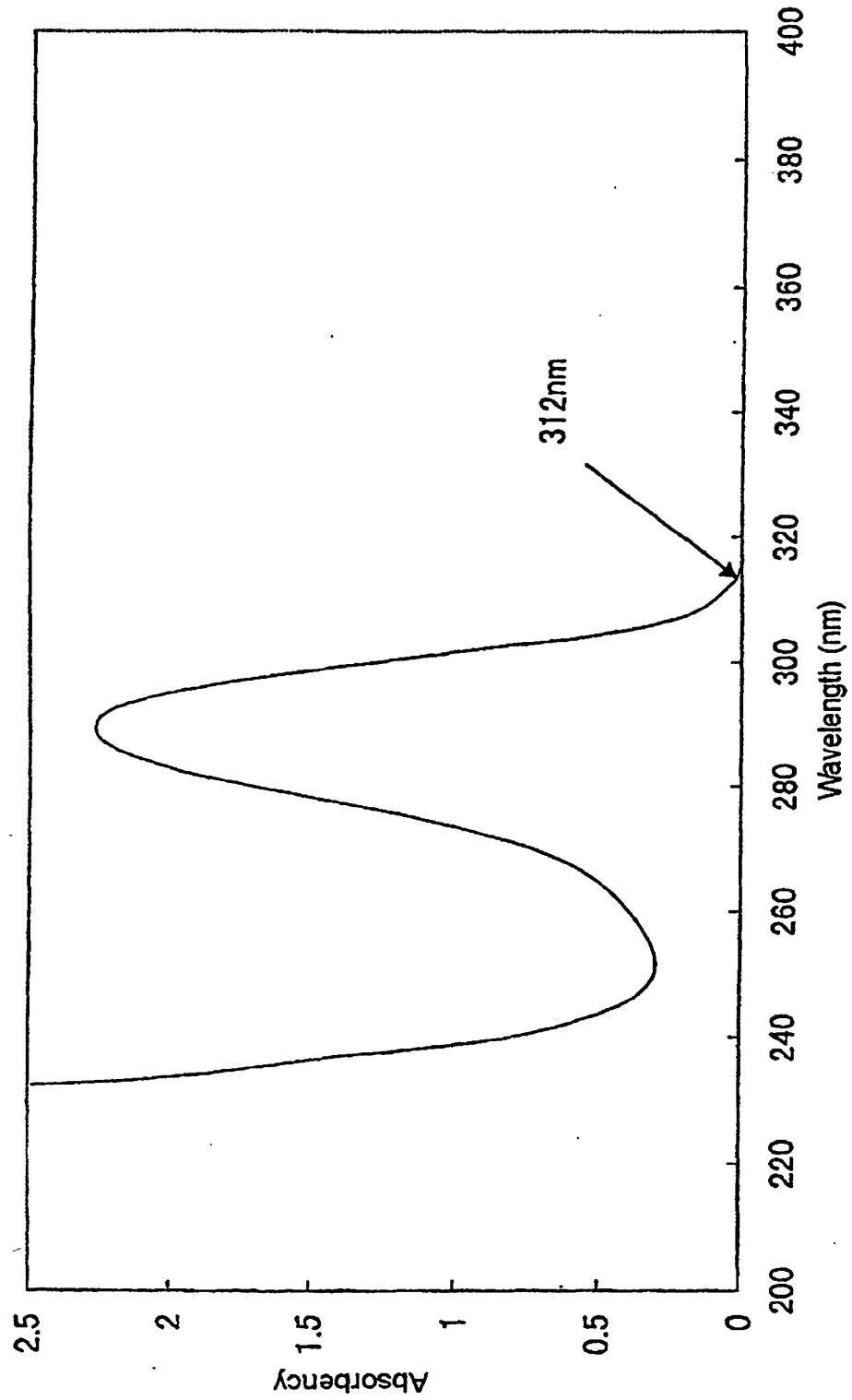




(wherein R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, and R<sup>4</sup>, which may be the same or different, each represent a hydrogen atom or a lower alkyl group, R<sup>5</sup> represents a hydrogen atom, a lower alkyl group, or a lower acyl group, X represents a monosaccharic residue or an oligosaccharic residue optionally having the hydrogen atom of the hydroxyl group in the saccharic residue substituted with a lower alkyl group or a lower acyl group, n represents an integer in the range of 0 - 6, and m represents an integer in the range of 1 - 6).

2. A dermatological agent for external use according to claim 1, wherein said chromanol glycoside is 2-(α-D-glycopyranosyl)methyl-2,5,7,8-tetramethyl chroman-6-ol, 2-(β-D-galactopyranosyl)methyl-2,5,7,8-tetramethyl chroman-6-ol, 2-(β-D-fructopyranosyl)methyl-2,5,7,8-tetramethyl chroman-6-ol, and 2-(α-D-mannopyranosyl)methyl-2,5,7,8-tetramethyl chroman-6-ol.
3. A dermatological agent for external use according to claim 1 or claim 2, which is an aqueous pharmaceutical preparation.
4. A dermatological agent for external use according to any of claims 1 - 3, which is an agent for preventing and curing dermatopathy.
5. A dermatological agent for external use according to claim 4, which is an agent for preventing and curing the disorder caused by the ultraviolet light, an agent for preventing and allaying the sedimentation of pigment in the skin, an agent for beautifying the skin in white, an agent for preventing the senescence of the skin, or an agent for activating cells.
6. A dermatological agent for external use according to any of claims 1 - 3, which is a cosmetic preparation.

FIG. 1



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02034

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>7</sup> A61K31/7048, A61K7/42, A61K7/48, A61P17/00, A61P43/00 // C07H15/26, C07H17/065																	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																	
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>7</sup> A61K31/7048, A61K7/00-7/50, A61P17/00, A61P43/00, C07H15/26, C07H17/065																	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA (STN), CAPLUS (STN), CAOLD (STN), REGISTRY (STN)																	
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>EP, 611152, A1 (CCI CORPOLATION), 17 August, 1994 (17.08.94)</td> <td>1-3, 6</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>&amp; JP, 7-118287, A &amp; US, 5478812, A &amp; US, 5889164, A</td> <td>1-6</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US, 5780445, A (BEIERSDORF AKTIENGESELLSCHAFT), 14 July, 1998 (14.07.98) &amp; JP, 9-67401, A &amp; EP, 726273, A1 &amp; DE, 19504398, A1</td> <td>1-6</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP, 10-72356, A (CCI Corporation), 17 March, 1998 (17.03.98) (Family: none)</td> <td>1-6</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	EP, 611152, A1 (CCI CORPOLATION), 17 August, 1994 (17.08.94)	1-3, 6	Y	& JP, 7-118287, A & US, 5478812, A & US, 5889164, A	1-6	Y	US, 5780445, A (BEIERSDORF AKTIENGESELLSCHAFT), 14 July, 1998 (14.07.98) & JP, 9-67401, A & EP, 726273, A1 & DE, 19504398, A1	1-6	A	JP, 10-72356, A (CCI Corporation), 17 March, 1998 (17.03.98) (Family: none)	1-6
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
X	EP, 611152, A1 (CCI CORPOLATION), 17 August, 1994 (17.08.94)	1-3, 6															
Y	& JP, 7-118287, A & US, 5478812, A & US, 5889164, A	1-6															
Y	US, 5780445, A (BEIERSDORF AKTIENGESELLSCHAFT), 14 July, 1998 (14.07.98) & JP, 9-67401, A & EP, 726273, A1 & DE, 19504398, A1	1-6															
A	JP, 10-72356, A (CCI Corporation), 17 March, 1998 (17.03.98) (Family: none)	1-6															
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																	
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family																	
Date of the actual completion of the international search 20 June, 2000 (20.06.00)		Date of mailing of the international search report 27 June, 2000 (27.06.00)															
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer															
Facsimile No.		Telephone No.															

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**